E 1330

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 8
1965

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÂNE
St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 1, p. 1—124, Bucureşti, februarie 1965

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU, I. VASILESCU, TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacţie:

CECILIA ŞELARIU

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 48 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134 — 135, Bucureşti, R.P. Română, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie"

ADRESA REDACŢIEI:

Bucureşti, *Str. Docenţilor nr. 20*
Raionul 30 Decembrie

GHEORGHE GHEORGHIU-DEJ

AMINTIREA TOVARĂŞULUI GHEORGHE GHEORGHIU-DEJ, VEŞNIC VIE ÎN INIMA PARTIDULUI, A CLASEI MUNCITOARE, A POPORULUI

La 19 martie partidul şi poporul nostru au suferit o grea pierdere : a încetat să bată inima tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej, fiu devotat al clasei muncitoare din Romînia, al poporului romîn.

Nemărginită este durerea noastră, a tuturor.

Tovarăşul Gheorghiu-Dej şi-a dăruit întreaga sa viaţă partidului clasei muncitoare, luptei revoluţionare pentru eliberarea oamenilor muncii, pentru fericirea poporului romîn şi a patriei noastre, pentru socialism. Înalt exemplu de fidelitate faţă de marxism-leninism, tovarăşul Gheorghiu-Dej a fost un eminent militant al mişcării comuniste şi muncitoreşti internaţionale, a luptat neobosit pentru prietenia şi unitatea ţărilor socialiste, pentru coeziunea partidelor comuniste, pentru cauza păcii şi libertăţii popoarelor.

În uriaşa sa activitate şi-au găsit expresie trăsăturile cele mai nobile ale eroicei noastre clase muncitoare, care este mîndră de a fi plămădit în mijlocul ei, în focul luptei conduse de partid, un asemenea conducător.

Născut la 8 noiembrie 1901 la Bîrlad, într-o familie de muncitori, tovarăşul Gheorghiu a început să muncească de la vîrsta de 11 ani ca ucenic în diferite ateliere şi fabrici, calificîndu-se ca muncitor electrician. Sub influenţa valului revoluţionar din Romînia de la sfîrşitul primului război mondial, însufleţit de ideile Marii Revoluţii Socialiste din Octombrie, tovarăşul Gheorghiu-Dej s-a înrolat din fragedă tinereţe în mişcarea muncitorească. El a participat, în rîndurile muncitorilor din Valea Trotuşului, la greva generală din 1920 — care a oglindit creşterea conştiinţei de clasă, a capacităţii de luptă a proletariatului romîn şi a evidenţiat necesitatea istorică a înfrîngerii oportunismului, a făuririi partidului de tip nou, Partidul Comunist din Romînia.

În anii următori, tovarăşul Gheorghiu-Dej ia parte la un şir de acţiuni muncitoreşti la Galaţi, fiind ales în conducerea sindicatului de la Atelierele C.F.R.

În 1930 el devine membru al Partidului Comunist, în rîndurile căruia avea să lupte pînă la ultima suflare.

În acei ani, cînd criza economică lovea greu masele muncitoare, activitatea partidului era paralizată de lupte fracţioniste care aduseseră

partidul la un pas de lichidare. Refacerea unității partidului, orientarea activității sale spre întărirea legăturilor cu masele muncitoare și în primul rînd cu detașamentele de bază ale proletariatului au făcut posibilă organizarea unor mari acțiuni muncitorești, culminînd cu eroicele lupte din februarie 1933 — în a căror pregătire și desfășurare s-au afirmat cu putere marile calități politice și organizatorice de conducător revoluționar ale tovarășului Gheorghiu-Dej.

La Galați și apoi la Dej, unde fusese mutat disciplinar, ca și la București, Iași, Cluj, Pașcani și în alte localități, tovarășul Gheorghiu-Dej, dînd exemplu de felul cum trebuie muncit în mijlocul maselor, a depus o intensă activitate pentru realizarea unității de acțiune a muncitorilor ceferiști.

În 1932, la Conferința pe țară a muncitorilor feroviari, tovarășul Gheorghiu-Dej a fost ales secretar al Comitetului Central de acțiune care, sub îndrumarea Comitetului Central al Partidului Comunist, a organizat nemijlocit lupta ceferiștilor.

Tovarășul Gheorghiu-Dej și-a îndeplinit în mod strălucit sarcinile de răspundere încredințate de partid în organizarea acestor lupte, care au constituit o cotitură în istoria întregii noastre mișcări muncitorești, au demonstrat capacitatea clasei muncitoare de a acționa ca forță socială conducătoare a poporului muncitor în lupta de eliberare, au deschis o pagină nouă în viața partidului. Întărindu-și rîndurile cu cele mai bune, mai combative și revoluționare cadre proletare, partidul s-a legat mai strîns de masele oamenilor muncii.

Procesul intentat de reacțiune în 1933—1934 conducătorilor muncitorimii ceferiste a fost transformat de Partidul Comunist într-o tribună de demascare a regimului burghezo-moșieresc, a politicii antinaționale și antipopulare a claselor dominante. Din banca acuzaților în lanțuri a răsunat cu vigoare și curaj, prin glasul tovarășului Gheorghiu-Dej, chemarea înflăcărată, mobilizatoare a partidului adresată maselor muncitoare de a lupta cu hotărîre pentru o viață mai bună, împotriva robiei capitaliste, pentru apărarea suveranității și independenței naționale.

Condamnat la 12 ani muncă silnică, tovarășul Gheorghiu-Dej a fost deținut în diferite închisori — Jilava, Văcărești, Craiova, Ocnele Mari, Aiud, Doftana, Caransebeș și în lagărul de la Tg. Jiu.

Gratiile temnițelor, sîrma ghimpată a lagărelor n-au putut să-i izoleze de partid, de clasa muncitoare, de popor pe militanții revoluționari. Simțind în permanență sprijinul partidului, solidaritatea maselor muncitoare și a unor largi cercuri democratice, ei au păstrat legătura cu viața și activitatea partidului, au înfruntat cu fermitate și dîrzenie regimul de teroare și exterminare din închisori, pe care le-au transformat în școli de călire revoluționară. Prin munca politico-ideologică desfășurată de comuniștii din închisori, în frunte cu tovarășul Gheorghiu-Dej, s-au făurit cadre oțelite de militanți comuniști, caracterizate prin capacitatea de a organiza masele muncitoare, prin clarviziune politică și combativitate revoluționară, cadre care au avut ulterior un rol de excepțională însemnătate în conducerea de către partid a luptei pentru cucerirea puterii de către oamenii muncii și construirea socialismului.

Aprecierea acordată de partid activității desfășurate de tovarășul Gheorghiu-Dej și-a găsit expresie în cooptarea sa, în 1935, pe cînd se afla în închisoare, ca membru al C.C. al P.C.R.

În anii războiului, tovarășul Gheorghiu-Dej împreună cu ceilalți tovarăși din închisori și lagăre își manifestau încrederea nestrămutată în victoria împotriva fascismului, solidaritatea frățească cu popoarele Uniunii Sovietice. În strînsă legătură cu cadrele de bază din afară, ei și-au pus întreaga experiență, tot elanul revoluționar în slujba organizării luptei antihitleriste a poporului romîn.

Tovarășului Gheorghiu-Dej îi revine meritul principal în demascarea și lichidarea clicii de trădători și capitulanți, infiltrate în conducerea partidului; înlăturarea agenturii trădătoare a constituit una din condițiile esențiale pentru ca partidul să-și poată îndeplini rolul conducător în lupta de eliberare națională și socială a poporului romîn.

Activul revoluționar al partidului, în frunte cu tovarășul Gheorghiu-Dej, a elaborat linia strategică și tactică pentru răsturnarea dictaturii militaro-fasciste și întoarcerea armelor împotriva Germaniei hitleriste. Partidul a trecut la organizarea formațiunilor de luptă patriotice, la realizarea Frontului Unic Muncitoresc cu partidul social-democrat, la înfăptuirea unui larg sistem de alianțe cu diferite grupări politice și atragere în lupta antihitleristă a unor personalități însuflețite de sentimente patriotice, la desfășurarea unei vaste activități în rîndurile armatei.

În zilele hotărîtoare pentru pregătirea insurecției, C.C. al partidului a organizat evadarea din lagăr a tovarășului Gheorghiu-Dej și a altor cadre de bază ale partidului.

Organizată și condusă de partid, insurecția armată a deschis o eră nouă în istoria poporului romîn, a însemnat începutul revoluției populare. Romînia s-a alăturat coaliției antihitleriste, Armata romînă, în totalitatea ei, a luptat umăr la umăr cu Armata sovietică pînă la zdrobirea Germaniei hitleriste. Sîngele vărsat în comun a cimentat prietenia și alianța indestructibilă dintre poporul romîn și poporul sovietic în lupta pentru cauza păcii și socialismului.

Tovarășul Gheorghiu-Dej a dat o contribuție de cea mai mare importanță la elaborarea liniei politice și tactice a partidului în desfășurarea furtunoasă a marilor bătălii de clasă de după 23 August 1944, muncind cu nesecată energie pentru înfăptuirea sarcinilor stabilite de partid — mobilizarea tuturor forțelor în războiul antihitlerist, refacerea economiei naționale, democratizarea țării, făurirea alianței muncitorești-țărănești în focul luptei pentru reforma agrară, instaurarea puterii populare.

Ca reprezentant al partidului și clasei muncitoare în guvern, tovarășul Gheorghiu-Dej a preluat, în noiembrie 1944, conducerea Ministerului Comunicațiilor și Lucrărilor Publice, fiind primul muncitor ministru în istoria politică a Romîniei.

Sub conducerea partidului, clasa muncitoare organizată în sindicatele unice revoluționare, masele largi țărănești care luptau pentru pămînt, partidele și grupările reunite în frontul național democrat dădeau lovituri zdrobitoare cercurilor reacționare. Valul luptei revoluționare a măturat un șir de guverne cu majoritate reacționară și a impus la 6 Martie 1945 aducerea la putere a primului guvern din țara noastră în care clasa muncitoare avea rolul precumpănitor.

La Conferința Națională a Partidului Comunist din octombrie 1945, tovarășul Gheorghiu-Dej a prezentat Raportul Politic al Comitetului Central, care cuprindea un amplu program de luptă pentru întărirea puterii populare, reconstrucția țării și consolidarea independenței naționale. În

acest program, de o largă perspectivă istorică, partidul, scrutînd departe în viitor, şi-a exprimat concepţia leninistă privitoare la construirea unei industrii puternice ca temelie a dezvoltării social-economice a Romîniei.

După Conferinţa Naţională, tovarăşul Gheorghiu-Dej a fost ales secretar general al Partidului Comunist Romîn.

În calitate de ministru al Economiei Naţionale şi apoi al Industriei şi Comerţului, ca preşedinte al Comisiei Ministeriale pentru redresarea economică, el a adus o contribuţie esenţială în lupta împotriva inflaţiei şi sabotajului economic al capitaliştilor, în pregătirea şi înfăptuirea programului din iunie 1947 de stabilizare monetară şi refacere a economiei naţionale.

Abolirea monarhiei şi proclamarea Republicii Populare Romîne au marcat cucerirea deplină a puterii de către clasa muncitoare în alianţă cu masele largi ale ţărănimii ; misiunea de a realiza actul abdicării regelui, la 30 Decembrie 1947, i-a revenit, din însărcinarea partidului şi guvernului şi în numele tuturor forţelor democratice, tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej, împreună cu doctorul Petru Groza.

Oamenii muncii, devenind singurii stăpîni ai ţării, au păşit cu însufleţire, sub conducerea partidului, la construirea societăţii socialiste.

Tovarăşul Gheorghe Gheorghiu-Dej a avut un rol deosebit în lupta partidului pentru realizarea unităţii politice şi organizatorice a clasei muncitoare — înfăptuită la Congresul de unificare din februarie 1948 prin crearea Partidului Muncitoresc Romîn pe baza principiilor ideologice şi organizatorice marxist-leniniste. Congresul l-a ales secretar general al Comitetului Central al Partidului Muncitoresc Romîn.

Prin istoricul act al naţionalizării, pregătit de partid sub îndrumarea nemijlocită a tovarăşului Gheorghiu-Dej, principalele mijloace de producţie industrială au devenit bun al întregului popor şi s-a creat o puternică temelie construcţiei socialiste în ţara noastră.

Partidul a orientat cu nestrămutată perseverenţă dezvoltarea Romîniei în direcţia transformării ei într-o ţară industrială, cu o agricultură înaintată. Tovarăşului Gheorghiu îi revin mari merite în elaborarea politicii de industrializare socialistă, ca pîrghie hotărîtoare a progresului rapid al ţării, a valorificării resurselor ei şi a dezvoltării tuturor ramurilor economiei în vederea creşterii continue a bunăstării celor ce muncesc — obiectivul fundamental al politicii partidului.

Călăuzit de teza marxist-leninistă că socialismul trebuie construit nu numai la oraşe ci şi la sate, partidul a pus la ordinea zilei rezolvarea celei mai complexe sarcini a construcţiei socialiste — transformarea socialistă a agriculturii. Întreaga muncă desfăşurată în acest domeniu s-a întemeiat pe linia exprimată în numele partidului de tovarăşul Gheorghiu-Dej la plenara din martie 1949 a Comitetului Central. Viaţa a confirmat în mod strălucit această linie politică ; înfăptuirea cu succes a cooperativizării agriculturii a deschis largi perspective dezvoltării intensive şi multilaterale a producţiei agricole, a ridicat pe o treaptă mai înaltă alianţa muncitorească-ţărănească.

Întreaga activitate a Comitetului Central în frunte cu tovarăşul Gheorghiu-Dej oglindeşte capacitatea de a aplica creator, la condiţiile ţării noastre, legile obiective, general-valabile, ale revoluţiei şi construcţiei socialiste, de a desprinde cerinţele specifice fiecărei etape istorice şi de a îndrepta în direcţia hotărîtoare eforturile partidului, ale poporului.

Aceste trăsături caracterizează munca efectuată de partid sub conducerea nemijlocită a tovarășului Gheorghiu pentru elaborarea planului de electrificare, a planurilor cincinale și a planului de șase ani, planuri a căror realizare, prin eforturile însuflețite ale întregului popor, a asigurat introducerea largă a tehnicii noi, dezvoltarea proporțională, armonioasă și mereu ascendentă a economiei naționale.

Îndeplinind cele mai înalte funcții de partid și de stat — președinte al Consiliului de Miniștri din 1952 pînă în 1955, prim-secretar al Comitetului Central al P.M.R. și președinte al Consiliului de Stat pînă în ultima clipă a vieții sale — tovarășul Gheorghe Gheorghiu-Dej avea un contact larg și direct cu poporul, studia cu deosebită luare aminte experiența maselor, manifesta o nemărginită încredere în puterea de creație a poporului — făuritorul istoriei și al tuturor marilor realizări ale Romîniei socialiste.

Exemplu de simplitate și modestie, el avea un neasemuit dar de a-și apropia oamenii, de a-i însufleți și a-i antrena la lupta pentru înfăptuirea sarcinilor trasate de partid; oamenii muncii păstrează neștearsă amintirea întîlnirilor cu tovarășul Gheorghiu, a sfaturilor sale de tovarăș și prieten care le vorbea în același grai al inimii.

Tovarășul Gheorghiu exprima cu deosebită căldură grija permanentă a partidului pentru educarea tineretului, nădejdea de mîine a țării, pentru promovarea femeilor în munci de răspundere în economie, în instituții de stat și în organizațiile obștești. El manifesta o neslăbită preocupare pentru satisfacerea setei de cultură și îmbogățirea vieții spirituale a poporului, pentru avîntul continuu al învățămîntului, acorda o mare atenție activității creatoare a intelectualilor, a oamenilor de știință, artă și cultură, cărora le împărtășea înalta prețuire a partidului pentru valoroasa lor contribuție la propășirea patriei.

În fruntea partidului, tovarășul Gheorghiu are merite deosebite în rezolvarea marxist-leninistă a problemei naționale în țara noastră, prin care au fost asigurate deplina egalitate în drepturi a tuturor oamenilor muncii și cimentarea prieteniei de nezdruncinat dintre poporul romîn și minoritățile naționale.

Timp de peste trei decenii, tovarășul Gheorghiu-Dej a adus o mare contribuție la călirea ideologică și organizatorică a partidului nostru. Minunat conducător de tip leninist, el a militat pentru întărirea partidului ca detașament combativ de avangardă al clasei muncitoare, strîns legat de mase, sînge din sîngele poporului, forța conducătoare în opera de construire a socialismului.

Partidul nostru s-a călit, a realizat o unitate și o coeziune fără precedent printr-o luptă intransigentă împotriva oricăror abateri de la ideologia și politica sa marxist-leninistă, împotriva elementelor antipartinice, fracționiste, oportuniste. În această luptă tovarășul Gheorghiu-Dej, cu înalta sa conștiință partinică și perspicacitate politică, cu ascuțitul său spirit de clasă, a avut un rol de frunte. Partidul Muncitoresc Romîn, strîns unit în jurul Comitetului său Central, este astăzi mai puternic decît oricînd.

Este pilduitoare pentru noi preocuparea neabătută a tovarășului Gheorghiu-Dej pentru întărirea continuă a rolului conducător al partidului în toate domeniile activității social-economice, pentru aplicarea neștirbită a normelor de muncă leniniste. În viața partidului, în activitatea conducerii

sale s-a înrădăcinat principiul muncii colective, toate hotărîrile și măsurile conducerii partidului fiind rodul activității și gîndirii colective ale Comitetului Central, Biroului său Politic.

Tovarășul Gheorghiu a depus o vastă activitate pentru sintetizarea experienței acumulate de partid în conducerea revoluției și construcției socialiste, pentru însușirea acestei experiențe de către membrii partidului, în vederea înarmării lor teoretice.

Patriot și internaționalist înflăcărat, tovarășul Gheorghiu-Dej a fost un strălucit exponent al politicii consecvente a partidului și statului nostru de prietenie și alianță frățească cu țările socialiste, de solidaritate cu lupta clasei muncitoare și a forțelor democratice de pretutindeni, cu mișcarea de eliberare națională a popoarelor, pentru unitatea tuturor forțelor progresului social. Exprimînd, cu energia și tenacitatea ce l-au caracterizat întotdeauna, poziția Partidului Muncitoresc Romîn, el a militat pentru unitatea țărilor socialiste, pentru coeziunea marii armate internaționale a comuniștilor, avînd convingerea că nu există îndatorire internațională mai înaltă decît aceea de a contribui la salvgardarea și întărirea acestei unități — chezășia victoriei cauzei socialismului în întreaga lume.

Sub conducerea Comitetului Central în frunte cu tovarășul Gheorghiu, partidul nostru a depus eforturi neprecupețite pentru promovarea și stricta aplicare în relațiile dintre partidele comuniste și dintre țările socialiste a normelor marxist-leniniste — ca cerință vitală pentru asigurarea și întărirea unității și coeziunii lor, pentru creșterea forței de atracție a ideilor socialismului în lume. Linia partidului în problemele vieții internaționale și ale mișcării comuniste mondiale, exprimată în Declarația plenarei lărgite din aprilie 1964 a C.C. al P.M.R., este urmată cu perseverență nestrămutată de întregul partid.

Eminent om de stat, tovarășul Gheorghiu-Dej a desfășurat o vastă activitate în elaborarea politicii externe a Republicii Populare Romîne, politică de consolidare a păcii, de luptă împotriva politicii agresive a cercurilor imperialiste, împotriva colonialismului, pentru sprijinirea dreptului popoarelor de a dispune singure de soarta lor, pentru dezvoltarea colaborării internaționale pe baza principiilor coexistenței pașnice a statelor cu orînduiri social-politice diferite.

Țara noastră așează ca temelie de neclintit a relațiilor sale internaționale respectarea egalității, suveranității și independenței popoarelor, neamestecul în treburile lor interne, pronunțîndu-se pentru stricta respectare și promovarea acestor principii pe arena internațională, în interesul colaborării și apropierii între popoare.

Toate succesele în domeniul politicii interne și internaționale ale Republicii Populare Romîne, toate realizările obținute în aceste decenii sînt strîns legate de activitatea desfășurată în fruntea Comitetului Central al partidului de tovarășul Gheorghiu-Dej.

Măsura operei titanice înfăptuite de popor sub conducerea partidului o dă deosebirea dintre tabloul întunecat al Romîniei de acum două decenii și înfățișarea de astăzi a țării, în care poporul romîn, liber de orice exploatare, stăpîn al destinelor sale, își făurește o viață fericită.

Scumpul nostru tovarăș Dej a închis ochii pentru vecie cu conștiința datoriei împlinite; el a putut vedea triumful idealurilor cărora

și-a dăruit viața, victoria deplină a socialismului în țara noastră, mersul rapid al Romîniei pe calea progresului economic și cultural.

În ultimele sale cuvinte adresate țării, prin scrisoarea trimisă recentei sesiuni a Marii Adunări Naționale, el își exprima convingerea îndreptățită că țara noastră va păși mai departe, neabătut, pe această cale ; cu nezdruncinată încredere, el arăta că înaintea Romîniei socialiste sînt deschise perspectivele unui viitor strălucit — viitor care stă în mîinile harnice și încercate ale poporului.

Comitetul Central al Partidului Muncitoresc Romîn, tovarășii de muncă și de luptă ai marelui dispărut își iau legămîntul solemn să întărească necontenit unitatea partidului și a conducerii sale, să continue neabătut linia generală, internă și internațională, a partidului, să nu-și cruțe forțele pentru a duce mereu înainte opera de construire a socialismului și comunismului, de înflorire a patriei și ridicare a bunăstării poporului — operă măreață căreia i-a consacrat întreaga viață tovarășul Gheorghiu-Dej.

Marea durere care ne îndoliază tuturor inima unește și mai strîns poporul în jurul partidului. Clasa muncitoare, țărănimea, intelectualitatea, toți oamenii muncii își înzecesc eforturile pentru a obține noi victorii, spre binele și prosperitatea patriei noastre socialiste.

Adio, scump prieten și tovarăș de luptă !

Numele tău va rămîne veșnic viu în inima partidului, în inima clasei muncitoare, a poporului romîn !

COMITETUL CENTRAL
AL
PARTIDULUI MUNCITORESC ROMÎN

HOTĂRÎREA

Comitetului Central al Partidului Muncitoresc Romîn, a Consiliului de Stat şi a Consiliului de Miniştri ale Republicii Populare Romîne

Pentru eternizarea memoriei tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej, Comitetul Central al Partidului Muncitoresc Romîn, Consiliul de Stat şi Consiliul de Miniştri ale Republicii Populare Romîne

HOTĂRĂSC:

1. Se vor edita lucrările tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej.
2. Se va edita biografia tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej.
3. Statuia tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej va fi ridicată în oraşele Bucureşti şi Cluj.
4. Bustul tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej va fi aşezat la Comitetul Central al Partidului Muncitoresc Romîn, Marea Adunare Naţională a Republicii Populare Romîne, clubul C.F.R. „Grivița Roşie" din oraşul Bucureşti şi la Casa de cultură din oraşul Galaţi.
5. Pe clădirile legate de activitatea tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej în perioada ilegalităţii vor fi aşezate plăci comemorative.
6. La Muzeul de Istorie a Partidului din oraşul Bucureşti se va organiza o sală memorială, consacrată vieţii şi activităţii tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej.
7. Se va institui bursa republicană „Gheorghe Gheorghiu-Dej", care va fi acordată celor mai merituoşi studenţi.
8. Se va atribui numele „Gheorghe Gheorghiu-Dej":
   a) Oraşului Oneşti
   b) Combinatului siderurgic Galaţi
   c) Hidrocentralei „16 Februarie" de pe Argeş
   d) Combinatului chimico-metalurgic din Baia Mare
   e) Institutului Politehnic din Bucureşti
   f) Casei de cultură a studenţilor din Cluj
   g) Unei şcoli medii de cultură generală din oraşul Bîrlad
   h) Unui bulevard şi unei pieţe din oraşul Bucureşti, precum şi unor pieţe şi străzi din alte oraşe importante din ţară.
9. Se va emite un timbru memorial cu efigia tovarăşului Gheorghe Gheorghiu-Dej.

COMITETUL CENTRAL
AL PARTIDULUI MUNCITORESC ROMÎN

CONSILIUL DE STAT
AL REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

CONSILIUL DE MINIŞTRI
AL REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 8 (1965) nr. 1

SUMAR

Pag.

M. IONESCU, Caracterul variabilităţii chimice a plantelor (cazul speciei *Zea Mays*) 3

L. M. BURUIANĂ şi V. PAVLU, Cercetări polarografice asupra proteinelor din plasma seminală. II. Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra proteinelor plasmatice 17

V. COMES, V. GALEA, M. WEINLICH şi D. SUCIU, în colaborare cu C. VALACZKAI, F. VLAD şi I. DÉNES, Necesarul de vitamină C la muncitorii expuşi la mercur 33

M. FURNICĂ, E. POPA şi O. POPOVICI, Acţiunea acidului dezoxiribonucleic extras din ţesuturi normale şi iradiate asupra activităţii catalazei hepatice. Nota I 43

I. KIŢULESCU, V. BĂLUŢĂ şi D. PASCU, Metodă pentru extragerea glicopeptidelor din materiale biologice (albuş de ou, ser uman) 49

I. KIŢULESCU, V. BĂLUŢĂ şi D. PASCU, Mucoproteinele serice ca mijloc de diferenţiere a proteazelor din serul animalelor purtătoare şi al celor nepurtătoare de tumori 55

D. MOŢET, Modificarea proprietăţilor antigenice ale proteinelor din serul sanguin uman în urma denaturării termice. II. Cercetări asupra fenomenului de „omogenizare electroforetică" 59

G. NEAMŢU, V. TĂMAŞ şi C. BODEA, Cercetări asupra pigmenţilor din plante endemice. I. Carotinoidele din *Astragalus peterfii* 67

E. PĂUNESCU şi L. BERGER, Valoarea unor teste biochimice pentru diagnosticul diferenţial al cancerului bronhopulmonar 71

T. RĂDULESCU şi D. COTARIU, Acţiunea narcozei asupra nivelului fosfocreatinei din muşchi 77

I. SZÁNTAI, Z. URAY şi V. KOVACS, Observaţii referitoare la schimbul izotopic între aminoacizii iodaţi şi ^{131}I pe hîrtia cromatografică 81

I. SZÁNTAI, Z. URAY şi T. HOLAN, Metodă rapidă de determinare a indicelui de conversiune a iodului mineral în iod proteic marcat cu ^{131}I. 85

C. ŞELARIU, V. GHEŢIE şi S. MIHĂESCU, Hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor şi anticorpilor fluorescenţi de iepure 89

L. VAICUM, E. GRUIA şi S. GODEANU, Determinarea unor activităţi enzimatice ca metodă de cercetare a nămolului activ 97

N. VOICULEŢ, F. CHIRALEU şi C. VILĂU, Studiul repartiţiei şi metabolizării substanţelor citostatice endoxan şi TSPA, marcate cu ^{32}P, la şobolani 109

RECENZII 121

St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 1, p. 1-124, Bucureşti, februarie 1965

St. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 3–16 (1965)

CARACTERUL VARIABILITĂŢII CHIMICE A PLANTELOR

(CAZUL SPECIEI *ZEA MAYS*)*

MIRCEA IONESCU
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.

577.1

Rezumat. — Variabilitatea însuşirilor chimice ale unei forme biologice constituie un fenomen legic, deoarece valorile care exprimă limitele acestei variabilităţi pentru diferitele condiţii de mediu se găsesc într-un raport de proporţionalitate inversă, din care cauză media acestor valori devine constantă pentru o aceeaşi formă biologică. Această valoare medie exprimă caracterul chimic ereditar al unei forme biologice ; ea variază cu natura formei biologice şi se modifică sub acţiunea mediului, determinînd o variabilitate a însuşirilor chimice ale cărei limite se condiţionează reciproc, făcînd ca plasticitatea unei forme biologice să apară nu numai ca un fenomen limitat, ci şi ca un fenomen condiţionat.

Caracterul chimic ereditar al unei forme biologice formează astfel adevărata caracteristică biochimică a unei specii sau subunităţi a ei. Compoziţia chimică medie nu reprezintă caracteristica biochimică a unei forme biologice oarecare, deoarece în mod obişnuit în această compoziţie nu se include de obicei în media valorilor cea a limitelor de variabilitate, ci alte valori care se găsesc înăuntrul acestor limite şi care se pot repeta de mai multe ori.

Determinarea caracterului chimic ereditar prezintă un deosebit interes practic, deoarece ne arată cum se modifică însuşirile chimice şi deci calitatea recoltelor sub acţiunea modificatoare a mediului, dîndu-ne astfel posibilitatea de dirijare a culturilor agricole, de alegere a diferitelor varietăţi şi de stabilire a celor mai proprii regiuni pedoclimatice pentru cultura acestora.

Numeroase date din literatura de specialitate arată că lumea vegetală manifestă o pronunţată variabilitate chimică. Variabilitatea chimică, ca şi cea morfologică, a unei specii este datorită atît acţiunii mediului exterior, cît şi eredităţii, care determină modificări metabolice. Organismele se leagă de mediul exterior datorită excitabilităţii ; organismele se leagă însă şi de părinţii şi de strămoşii lor, datorită autoreproducerii [1–3].

Prin autoreproducere organismul transmite urmaşului atît caracterele sale ereditare, adică acele caractere pe care le-a moştenit şi el de

* Lucrare publicată în Rev. Roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba franceză.

la părinții și strămoșii săi, cît și caracterele pe care el însuși le-a dobîndit în timpul existenței sale prin adaptarea metabolismului său la condițiile mediului exterior.

Inițial, metabolismul urmașului este identic în trăsăturile sale cu cel al strămoșului din care descinde. Ereditatea determină deci tipul metabolismului. Acesta este legat și de mediul exterior, deoarece natura și intensitatea proceselor chimice ale fiecărei organizații metabolice sînt reglate de condițiile mediului exterior, care obligă organismul la adaptare; din această cauză fiecare dintre aceste organizații metabolice exprimă un anumit echilibru biochimic între organism și mediu, echilibru care se reflectă în alcătuirea chimică a organismului.

Tipul metabolismului fiecărui organism este deci determinat de ereditate și modificat de acțiunea mediului exterior, care provoacă variabilitatea adaptativă a eredității.

Numeroase date arată variabilitatea caracterelor chimice la diferitele specii sub acțiunea modificatoare a mediului.

Cercetările de pînă acum [4] referitoare la variabilitatea caracterelor chimice ale speciilor vegetale au dus la o serie de concluzii, care în mod cu totul general se pot formula în felul următor:

1. Semințele, ca și părțile vegetative ale diferitelor plante de cultură, prezintă o mare variabilitate pentru fiecare componentă chimică.

2. Variabilitatea caracterelor chimice se manifestă nu numai între diferitele specii, genuri, familii și soiuri sau varietăți, ci chiar în interiorul aceluiași soi sau al aceleiași varietăți.

3. Variabilitatea caracterelor chimice poate forma o caracteristică biochimică pentru diferitele specii vegetale sau subunități ale lor.

4. Caracterele biochimice ale plantelor sînt tot atît de variabile ca și caracterele lor morfologice.

5. Cu cît grupele de plante sînt mai depărtate din punct de vedere sistematic, cu atît mai mult se deosebesc ele și din punct de vedere biochimic. Deosebirile între soiuri — în limitele unei specii — sînt evidente, dar nu sînt mari, după părerea lui Blagovescenschi [4]. Principiul lui Darwin referitor la divergența caracterelor poate fi tot atît de bine fundamentat biochimic, ca și morfologic. Datorită caracterelor biochimice, se pot caracteriza diferite specii, genuri, familii și chiar ordine după metabolismul care le este propriu.

6. Formarea noilor caractere biochimice sub influența mediului exterior și a noilor enzime specifice de calitate superioară este un factor puternic al selecției naturale. Apariția noilor caractere biochimice, care au drept consecință formarea fermenților de calitate superioară, mărește rezistența plantelor la diferitele acțiuni nefavorabile ale mediului exterior — frig, secetă, bacterioze, micoze etc.

★

Variabilitatea caracterelor chimice ale speciilor vegetale reprezintă, în realitate, un fenomen și mai profund. În lucrarea de față arătăm unele aspecte necunoscute pe care le are acest fenomen.

Cercetările pe care le-am efectuat pe seminţele a numeroase recolte de porumb obţinute în Romînia într-o perioadă de 30 de ani au arătat care este compoziţia chimică a boabelor provenite din diferite soiuri şi varietăţi hibride ale porumbului, cultivate în diferite regiuni ale ţării [5—16].

Datele chimice prezentate de noi au arătat astfel cît de variată este compoziţia chimică a diferitelor soiuri şi varietăţi. Prelucrarea materialului adus de noi în această lungă perioadă de cercetări — în care s-au întîlnit în cultura diferitelor soiuri şi varietăţi hibride ale porumbului cele mai diferite condiţii pedoclimatice — face obiectul lucrării de faţă; el duce la o serie de concluzii. Aceste concluzii se referă la modificarea caracterelor morfologice şi mai ales a caracterelor chimice ale diferitelor varietăţi de porumb sub influenţa mediului şi a eredităţii; ele ne arată că variabilitatea chimică a diferitelor forme biologice are un caracter legic necunoscut pînă acum, cu ajutorul căruia se pot stabili valori care exprimă caracterul chimic ereditar şi adevărata caracteristică biochimică a unei forme biologice. Acest fenomen de biologie cantitativă prezintă, cum vom vedea, un deosebit interes din punct de vedere agricol.

Aspectul legic al variabilităţii caracterelor morfologice şi mai ales chimice pe care îl iau diferitele forme biologice ale speciei *Zea mays* rezultă din datele înscrise în tabelele nr. 1—8 din prezenta lucrare. Cu ajutorul acestor date arătăm cum se modifică caracterul chimic al unei forme biologice sub acţiunea diferită a mediului exterior, cum intervine mediul şi ereditatea în variabilitatea caracterelor chimice ale diferitelor forme biologice ale unei specii şi cum — datorită aspectului legic pe care-l prezintă aceste modificări — se pot stabili valorile care exprimă caracterul chimic ereditar al diferitelor forme biologice. În adevăr:

§ 1. În tabelele nr. 1, 2 şi 3 (coloanele 3 şi 4) dăm valorile maxime şi minime, care exprimă conţinutul proteic al soiurilor „Dinte de cal", „Romînesc" şi „Portocaliu", cultivate timp de 22 de ani în diferitele regiuni pedoclimatice ale ţării. Aceste valori arată limitele variabilităţii caracterelor proteice în fiecare regiune pedoclimatică în care a fost cultivat soiul, exprimînd astfel plasticitatea pe care o are soiul pentru anumite condiţii ale mediului exterior. Cu ajutorul acestor limite, am înscris în aceleaşi tabele, pe de o parte, valorile care exprimă diferenţa dintre limitele variabilităţii caracterelor proteice ale aceluiaşi soi cultivat în fiecare dintre diferitele regiuni pedoclimatice de cultură (coloana a 5-a) adică amplitudinea variabilităţii, iar pe de altă parte valorile ce exprimă media acestor limite (coloana a 6-a).

Din examinarea datelor înscrise în tabelele nr. 1, 2 şi 3 desprindem următoarele concluzii:

1. Fiecare soi — şi deci fiecare formă biologică a speciei *Zea mays* — manifestă o variabilitate a caracterelor chimice în diferite condiţii de mediu.

2. Gradul acestei variabilităţi, pe care o suferă un acelaşi soi şi deci o aceeaşi formă biologică, este măsurat de diferenţa valorilor care exprimă limitele variabilităţii. Această diferenţă reprezintă amplitudinea variabilităţii; ea este diferită pentru un acelaşi soi (sau o aceeaşi formă biologică) în diferitele condiţii pedoclimatice. Amplitudinea, care mă-

Tabela nr. 1

Limitele variabilității, amplitudinea și media conținutului proteic al soiului „Dinte de cal" cultivat în diferite condiții pedoclimatice

Regiunea de cultură pedoclimatică	Numărul probelor cercetate*	Limitele variabilității chimice		Amplitudinea variabilității chimice	Media limitelor de variabilitate	Abatere
		Maxima	Minima			
Crișana sud-vestică și Banatul vestic	71	14,2	8,0	6,2	11,10	—
Cîmpia munteană și Dobrogea sudică	186	13,9	8,8	5,1	11,3	0,2
Sud-estul Moldovei și versantul sudic al Caparților Meridionali	40	13,3	8,4	4,9	10,9	—0,2
Banatul estic și cîmpia Olteniei	35	13,0	8,5	4,5	10,8	—0,3
Podișul Transilvaniei	41	13,0	9,3	3,7	11,2	0,1
Satu-Mare, Crișana nordică și sud-estică	25	13,2	9,3	3,9	11,2	0,1
Dobrogea nordică și podișul Moldovei	27	13,1	10,1	3,0	11,6	0,5
Maramureșul și versanții Caparților Răsăriteni	7	12,6	9,9	2,7	11,2	0,1
Regiunea Munților Apuseni	6	12,5	10,8	1,7	11,6	0,5

* Recoltele anilor 1934 — 1939 și 1945 — 1960 (22 de recolte).

soară gradul variabilității caracterelor chimice ale unei forme biologice, este deci o valoare dependentă de natura condițiilor de mediu.

3. Variabilitatea caracterelor chimice ale unui aceluiași soi sau forme biologice reprezintă un fenomen legic care, după cunoștințele noastre, nu a fost semnalat pînă acum; în adevăr, valorile care exprimă limitele acestei variabilități prezintă regularități: cînd limitele maxime scad, cele minime cresc, după cum rezultă din examinarea comparativă a datelor înscrise în coloanele 3 și 4 din tabelele nr. 1, 2 și 3.

Limitele variabilității caracterelor chimice pot să ia, prin urmare, valori diferite — după intensitatea acțiunii modificatoare a mediului —, dar aceste limite sînt condiționate reciproc, fiind compensate între ele și determinînd un raport de proporționalitate inversă. Din această cauză media valorilor care exprimă aceste limite este în toate cazurile aceeași, este o constantă pentru un același soi (pentru o aceeași formă biologică), după

Tabela nr. 2

Limitele variabilității, ampitudinea și media conținutului proteic al soiului „Rominesc" cultivat în diferite condiții pedoclimatice

Regiunea de cultură pedoclimatică	Numărul* probelor cercetate	Limitele variabilității		Amplitudinea variabilității chimice	Media limitelor de variabilitate	Abatere
		Maxima	Minima			
Sud-estul Moldovei și versantul sudic al Carpaților Meridionali	34	13,7	8,18	5,5	10,94	—
Banatul estic și cîmpia Olteniei	51	13,6	9,3	4,3	11,4	0,4
Cîmpia muntеană și sudul Dobrogii	44	13,1	9,4	3,7	11,3	0,3
Podișul Transilvaniei	18	12,8	9,6	3,2	11,2	0,2
Crișana (S—SV) și Banatul vestic	33	12,4	9,6	2,8	11,0	0,0
Regiunea Munților Apuseni	5	11,8	10,3	1,5	11,1	0,1
Cîmpia Transilvaniei	3	11,2	10,1	1,1	10,7	—0,2

*Recoltele anilor 1934—1939 și 1945—1960 (22 de recolte).

cum rezultă din datele înscrise în coloana a 6-a a tabelelor nr. 1, 2 și 3; aceste valori, care sînt deci aceleași în diferitele condiții de mediu, exprimă sau reflectă, după părerea noastră, caracterul specific, intrinsec al soiului, și anume caracterul ereditar al acelei forme biologice; acest caracter depinde de natura fiecărei forme biologice, deoarece valoarea lui este diferită de la un soi la altul, după cum rezultă din examinarea comparativă a datelor înscrise în coloana a 6-a a celor trei tabele nr. 1, 2 și 3, unde el este 11,1% pentru soiul „Dinte de cal", de 10,94% pentru soiul „Romînesc" și de 12,0% pentru soiul „Portocaliu".

Raportul de proporționalitate inversă între valorile care exprimă limitele maxime și minime ale variabilității caracterelor chimice pentru un același soi sau varietate, în funcție de condițiile de mediu, ne duce în mod necesar la concluzia că acțiunea modificatoare a mediului asupra unei specii sau subunități a ei este limitată, fiind frînată de un factor intern — caracteristic fiecărei specii sau subunități a ei —, ereditatea însușirilor chimice. Acest factor are aceeași valoare pentru o aceeași formă biologică și se regăsește în toate cazurile în care acțiunea modificatoare diferită a mediului determină o variabilitate diferită a caracterelor chimice.

Caracterul chimic ereditar este deci o constantă caracteristică pentru fiecare formă biologică; valoarea care exprimă acest caracter se

Tabela nr. 3

Limitele variabilităţii, amplitudinea şi media conţinutului proteic al soiului „Portocaliu" cultivat în diferite condiţii pedoclimatice

Regiunea de cultură pedoclimatică	Numărul* probelor cercetate	Limitele variabilităţii		Amplitudinea variabilităţii chimice	Media limitelor de variabilitate	Abatere
		Maxima	Minima			
Sud-estul Moldovei şi versantul sudic al Carpaţilor Meridionali	60	15,0	8,9	6,1	12,0	
Dobrogea nordică şi podişul Moldovei	105	14,9	9,4	5,5	12,2	0,2
Regiunea Munţilor Apuseni	5	14,1	10,9	3,2	12,5	0,5
Podişul Transilvaniei	20	13,9	10,6	3,3	12,2	0,2
Cîmpia Transilvaniei	17	14,2	11,1	3,0	12,7	0,7
Cîmpia munteană şi sudul Dobrogii	20	13,8	11,0	2,9	12,4	0,4
Podişul nordic moldovenesc	16	13,4	10,7	2,8	12,1	0,1
Banatul estic şi cîmpia Olteniei	5	13,4	10,8	2,7	12,1	0,1
Maramureşul şi versanţii Carpaţilor Răsăriteni	3	12,8	11,9	1,0	12,3	0,3

*Recoltele anilor 1934–1939 şi 1945–1960.

modifică însă sub influenţa mediului, determinînd o variabilitate cuprinsă între anumite limite, a căror valoare depinde de natura şi intensitatea acţiunii modificatoare a mediului.

Din cauza acestor raporturi de interdependenţă, valorile care exprimă limita maximă a variabilităţii sînt pentru orice condiţii de mediu mai mari decît valoarea care exprimă caracterul chimic ereditar, iar cele care exprimă limita minimă sînt totdeauna mai mici. Aceste fapte ne duc la concluzia că plasticitatea unei forme biologice, care depinde de caracterul ei ereditar, apare nu numai ca un fenomen limitat, ci şi ca un fenomen condiţionat care nu a fost cunoscut pînă acum.

Conţinutul proteic al soiurilor de porumb studiate reprezintă deci o însuşire ereditară deosebit de stabilă, care rezultă din valorile care exprimă media limitelor de variabilitate obţinute în diferitele zone pedoclimatice.

Cercetările noastre arată astfel că noțiunea de „caracteristică biochimică" a unei unități biologice este dată de caracterul chimic ereditar al unei forme biologice, caracter care rezultă din media limitelor extreme ale variabilității și nu, cum se considera pînă acum, din media unui număr de valori ce exprimă compoziția chimică diferită pe care o ia aceeași formă biologică atunci cînd este cultivată în diferite condiții de mediu.

★

§ 2. Caracterul chimic ereditar — exprimat de media limitelor de variabilitate ale unei forme biologice — a fost stabilit de noi nu numai pentru proteina din soiurile „Dinte de cal", „Romînesc", „Portocaliu", așa cum am văzut, ci și pentru proteina din soiurile „Hîngănesc", „Moldovenesc" și „Cincantin", precum și pentru amidonul acestor 6 soiuri, după cum rezultă din tabelele nr. 4 și 5, în care sînt înscrise limitele de variabilitate proteică și amidonoasă ale celor 6 soiuri (tabela nr. 4), precum și greutatea a 1 000 de boabe, greutatea hectolitrică, durata vegetației și caracterul ereditar proteic și amidonos al acestor 6 soiuri (tabela nr. 5).

Din examinarea datelor înscrise în tabela nr. 4 se desprind următoarele concluzii:

1. Valorile care exprimă limitele maxime și minime ale variabilității proteice și amidonoase a diferitelor soiuri prezintă și ele regularități: cînd limitele maxime proteice ale diferitelor soiuri sînt așezate în ordinea lor crescîndă, limitele minime proteice cresc și ele, iar limitele maxime și minime ale amidonului scad.

2. Între valorile care exprimă conținutul proteic maxim sau minim al diferitelor soiuri și cele care exprimă conținutul în amidon maxim sau minim este un raport de proporționalitate inversă.

Tabela nr. 4

Limitele variabilității chimice a 6 soiuri de porumb cultivat în Rominia în diferitele regiuni pedoclimatice (recoltele anilor 1934—1939 și 1945—1949)

Soiul	Numărul probelor analizate	Principii imediați la 100 g substanță uscată:			
		Proteină		Amidon	
		maxima	minima	maxima	minima
„Dinte de cal"	349	13,92	8,0	76,67	68,50
„Romînesc"	158	13,65	8,18	75,31	67,64
„Hîngă nesc"	48	13,67	9,38	75,18	67,29
„Moldovenesc"	82	13,73	9,60	74,36	66,75
„Portocaliu"	246	14,92	9,38	74,29	62,71
„Cincantin"	92	15,23	10,22	73,21	61,00
Limitele extreme generale		15,23	8,00	76,67	61,00

Tabela nr. 5

Greutatea a 1 000 de boabe, greutatea hectolitrică, durata vegetației și caracterul ereditar proteic, amidonos și gras a 6 soiuri de porumb cultivate în Romînia, în diferitele regiuni pedoclimatice (recoltele anilor 1935—1939 și 1945—1949)

Soiul	Greutatea a 1 000 de boabe (g)	Greutatea hectolitrică	Durata vegetației de la răsărire (zile)	Caracterul ereditar (g la 100 g subst. uscată)			Raportul amidon/ proteină (media)
				proteine	amidon	grăsime	
„Dinte de cal"	318	72,3	148	10,96	72,58	5,36	6,62
„Romînesc"	300	74,7	140	10,92	71,97	5,54	6,59
„Hîngănesc"	230	77,0	118	11,52	71,23	5,20	6,18
„Moldovenesc"	219	79,0	—	11,67	70,55	5,87	6,05
„Portocaliu"	170	80,0	131	12,15	68,50	6,12	5,64
„Cincantin"	108	81,2	123	12,72	67,10	6,11	5,27

3. Între valorile care exprimă conținutul maxim și minim al proteinei sau al amidonului nu mai apare un raport de proporționalitate inversă, așa cum se întîmplă între valorile care exprimă conținutul maxim și minim al proteinei sau al amidonului pe care îl are un același soi sau varietate, cultivată în diferite condiții pedoclimatice (vezi tabelele nr. 1, 2 și 3); în acest caz, între valorile care exprimă conținutul maxim și minim al proteinei sau al amidonului există un raport de proporționalitate directă, deoarece acest conținut se referă la soiuri sau varietăți diferite.

Din examinarea datelor înscrise în tabela nr. 5 se desprind următoarele concluzii :

1. Caracterul ereditar proteic și amidonos diferă de la un soi la altul și este caracteristic pentru fiecare soi sau varietate.

2. Valorile care exprimă caracterul chimic ereditar al diferitelor soiuri sau varietăți prezintă de asemenea regularități : între conținutul în proteină și cel în amidon al diferitelor soiuri există un raport de proporționalitate inversă ; mai mult decît atît, conținutul în proteine crește, iar cel în amidon scade, cu cît bobul diferitelor soiuri este mai mic[1] și cu cît durata mijlocie de vegetație a fiecărui soi este mai mică. Soiurile cele mai timpurii, soiurile cu anabolism glucidic mai redus, au astfel bobul mai mic, proporția amidonului mai redusă, din care cauză proteinele apar în proporție mai mare ; faptele se petrec invers pentru soiurile cele mai tardive.

Caracterul chimic și structura morfologică a fiecărei forme biologice sînt deci în strînsă legătură, condiționîndu-se reciproc, și apar ca un reflex al condițiilor de mediu în care se dezvoltă.

Variabilitatea chimică — ca rezultat al dependenței dintre organism și mediu — determină astfel variabilitatea morfologică.

[1] Cu cît bobul diferitelor soiuri este mai greu și are o greutate hectolitrică mai mare.

Între variabilitatea chimică și structura morfologică apar astfel relații bine definite, regularități, care pînă în prezent nu au fost precizate, după cunoștințele noastre.

★

§ 3. Valorile care exprimă caracterul chimic ereditar nu sînt identice cu cele care exprimă compoziția chimică pe care o ia o formă biologică oarecare cînd este cultivată în diferite condiții de mediu și care pînă acum era considerată ca exprimînd caracteristica biochimică a unei unități biologice oarecare. Între caracterul chimic ereditar al unei forme biologice și conținutul care exprimă media din numărul probelor analizate există diferențe. După cum rezultă din datele înscrise în tabela nr. 6, aceste diferențe nu sînt mari, deoarece nu depășesc simțitor valori care sînt în limita permisă a erorilor; din această cauză acest conținut, care exprimă media din numărul probelor analizate, este apropiat de valoarea care exprimă caracterul ereditar proteic sau amidonos al diferitelor soiuri; în astfel de cazuri, caracterul legic al variabilității rămîne vizibil. Aceste diferențe nu sînt însă totdeauna mici; cînd conținutul proteic sau în amidon

Tabela nr. 6

Conținutul mediu în proteină și amidon a 6 soiuri de porumb cultivate în Rominia (recoltele anilor 1934—1939 și 1945—1949)

Soiul	Numărul probelor analizate	Principii imediați la 100 g substanță uscată			
		Proteină		Amidon	
		Media limitelor de oscilație	Media din nr. probelor analizate	Media limitelor de oscilație	Media din nr. probelor analizate
„Dinte de cal"	349	10,96	11,25	72,58	71,52
„Rominesc"	158	10,92	11,28	71,97	71,89
„Hîngănesc"	43	11,52	11,42	71,23	71,28
„Moldovenesc"	82	11,66	12,08	70,55	70,82
„Portocaliu"	246	12,15	12,72	68,50	69,23
„Cincantin"	92	12,72	13,00	67,10	67,87

rezultă dintr-o singură determinare izolată (dintr-o singură probă) sau dintr-un număr mai mare de determinări (de probe), care nu includ însă valorile ce exprimă limitele de variabilitate ale soiului și, cînd repetă mai ales o aceeași valoare din intervalul limitelor de variabilitate, diferențele față de caracterul ereditar pot fi foarte mari, iar caracterul legic al variabilității nu mai apare, după cum rezultă din datele înscrise în tabela nr. 7. În adevăr, raportul de proporționalitate inversă dintre conținutul în amidon și proteină pe care l-am găsit în cazul soiurilor înscrise în tabela nr. 5 nu mai apare în cazul hibrizilor dubli de porumb cultivați la Fundulea în anii 1957—1959, care reprezintă trei condiții climatice diferite;

Tabela nr. 7

Conținutul în amidon și proteină a hibrizilor dubli cultivați la Fundulea (1957, 1958, 1959)

Hibridul dublu	Conținutul în proteină în anii				Conținutul în amidon în anii				Raportul amidon/ proteină
	1957	1958	1959	Conț. mediu	1957	1958	1959	Conținut mediu	
„Pioneer 301"	11,94 —	9,86 —	12,45 —	— 11,41	71,91 —	69,74 —	66,64 —	— 69,43	6,08
„Wanwick 401"	11,55 —	10,29 —	12,89 —	— 11,58	72,45 —	67,33 —	65,98 —	— 68,59	5,92
„Pioneer 345"	12,03 —	12,00 —	11,53 —	— 11,85	70,30 —	68,24 —	65,13 —	— 68,12	5,75
„Wisconsin 641"	12,61 —	11,58 —	13,04 —	— 12,21	70,30 —	68,24 —	65,13 —	— 67,98	5,57
„Wisconsin 335 A"	12,46 —	11,96 —	13,34 —	— 12,59	69,85 —	68,27 —	64,22 —	— 67,45	5,12
„K.A. 4"	11,84 —	12,25 —	11,69 —	— 11,93	70,17 —	66,77 —	64,78 —	— 67,24	5,63
„K.S. 2"	12,23 —	12,31 —	12,86 —	— 12,47	69,69 —	63,84 —	66,77 —	— 66,76	5,35

valorile care exprimă conținutul în amidon nu se găsesc într-un raport invers cu cele care exprimă conținutul proteic pentru cei 7 hibrizi dubli considerați nici în cazul anului 1957, nici în cel al anilor 1958 și 1959, cînd condițiile climatice diferite[2] au determinat pentru fiecare hibrid dublu o variabilitate chimică, proteică și amidonoasă (compară datele din coloanele 2 și 6, 3 și 7, 4 și 8 din tabela nr. 7).

Dacă însă pentru fiecare dintre hibrizii dubli cultivați la Fundulea trei ani consecutivi — care reprezintă trei condiții climatice diferite — facem media valorilor în amidon, ca și în proteină, dacă adică includem în media valorilor pe acelea a limitelor de variabilitate a amidonului și proteinei pentru fiecare hibrid dublu, cultivat în condiții bioclimatice diferite, dacă adică obținem valorile caracterului ereditar, raportul de proporționalitate inversă dintre amidon și proteină apare (compară datele din coloanele 5 și 9 din tabela nr. 7). Acest raport de proporționalitate inversă nu este perfect riguros, datorită faptului că pentru această scurtă perioadă de 3 ani nu s-au putut include pentru varietățile hibride „K.A. 1" și „K.S. 2" valorile care exprimă limitele cele mai largi ale variabilității, și deci care permit în mod riguros stabilirea caracterului chimic ereditar.

„Compoziția chimică medie" nu reprezintă deci adevărata „caracteristică biochimică" a unei forme biologice oarecare, deoarece în mod obișnuit în această compoziție nu se include în media valorilor cea a limitelor de variabilitate, ci numai valori care se găsesc înăuntrul acestor limite și din care unele se pot repeta de mai multe ori. Numai caracterul chimic ereditar formează deci pentru noi adevărata caracteristică biochimică a unei specii sau subunități a ei.

★

§ 4. Caracterul legic al variabilității însușirilor chimice reprezintă un fenomen general; el a putut fi găsit de noi în cazul celor mai diferite forme biologice ale speciei *Zea mays*, iar stabilirea acestui caracter, prin determinarea variabilității însușirilor chimice ale diferitelor varietăți prezintă un deosebit interes practic, deoarece dă posibilitatea de dirijare a culturilor agricole, de alegere a diferitelor varietăți și de stabilire a celor mai proprii regiuni pedoclimatice pentru cultura acestora, în scopul de a obține recolte cu anumite caracteristici chimice, și deci cu o anumită calitate și valoare alimentară. Aceste concluzii ale noastre rezultă din tabela nr. 8, unde sînt înscrise trei serii de date, și anume:

a) Date referitoare la conținutul în proteine al unui număr de 9 hibrizi dublii de porumb, cultivați fiecare în 6 regiuni pedoclimatice diferite din țara noastră.

b) Date referitoare la caracterul proteic ereditar al fiecărui hibrid dublu considerat.

c) Date referitoare la caracterul proteic imprimat de fiecare regiune pedoclimatică, date înscrise în ordonată, în ordinea crescîndă a valorilor ce-l definesc.

---

[2] Anul 1959 a fost foarte secetos în comparație cu anul 1957.

Caracterul proteic ereditar al fiecărui hibrid dublu a fost determinat de noi din media valorilor ce exprimă limitele de variabilitate ale caracterului proteic al acestui hibrid dublu, cultivat în fiecare dintre cele 6 regiuni pedoclimatice.

Caracterul proteic imprimat de fiecare regiune pedoclimatică a fost determinat de noi din media valorilor ce exprimă limitele de variabilitate ale conținutului proteic pe care îl au diferiții hibrizi dublii de porumb, cultivați în aceeași regiune pedoclimatică.

Din examinarea datelor înscrise în tabela nr. 8 se desprind următoarele concluzii :

1. Varietățile de porumb dublu hibrid manifestă o pronunțată variabilitate a caracterelor chimice, care este datorită atît influenței mediului, cît și eredității, deoarece conținutul proteic nu este același nici pentru un același hibrid dublu cultivat în diferite regiuni pedoclimatice, nici pentru diferiții hibrizi dubli cultivați, toți într-o aceeași regiune.

Modificările metabolice ale hibrizilor dubli sînt deci datorite atît influenței mediului extern, cît și eredității.

Modificările metabolice datorite acțiunii diferite a mediului exterior — adică datorite acțiunii factorilor pedoclimatici și agrotehnici — pot duce, prin urmare, chiar pentru o aceeași varietate, la recolte de diferite calități (la recolte mai proteice, mai amidonoase, mai grase, mai vitaminice etc.).

2. În fiecare regiune pedoclimatică conținutul proteic al diferiților hibrizi dubli crește în ordinea crescîndă a conținutului lor proteic ereditar.

Limitele de variabilitate ale conținutului proteic pe care îl au diferiții hibrizi dubli cultivați în aceeași regiune — deci amplitudinea lor — sînt cu atît mai mici, cu cît caracterul proteic pe care îl imprimă regiunea pedoclimatică este mai mare ; din această cauză aceste din urmă regiuni mai secetoase sînt cele mai proprii pentru obținerea de sortimente proteice din orice hibrid dublu.

3. În diferite regiuni pedoclimatice conținutul proteic al fiecărei varietăți dublu hibride se mărește în ordinea crescîndă a caracterului proteic pe care îl imprimă regiunea pedoclimatică de cultură (în ordinea crescîndă a caracterului mai secetos al regiunii).

Limitele de variabilitate a conținutului proteic pe care îl are fiecare hibrid dublu, cultivat în diferite regiuni pedoclimatice, deci amptitudinea lui proteică, sînt cu atît mai mici cu cît caracterul proteic ereditar al hibridului este mai mare.

Sub acțiunea mediului și a eredității modificările metabolice pot fi deci foarte pronunțate, ducînd pentru varietățile hibride ale porumbului la variabilități proteice de la simplu la dublu (de la 8,73 la 14,20%).

4. Regularitățile observate în variabilitatea chimică a diferiților hibrizi sub acțiunea modificatoare a mediului ne permit să putem stabili pentru fiecare hibrid dublu care sînt sortimentele cele mai proteice și deci cele mai puțin amidonoase și care este regiunea pedoclimatică cea mai proprie pentru cultura lor ; în adevăr, ducînd în tabela nr. 8 o diagonală din dreapta sus înspre stînga jos, se poate ușor constata că varietățile și regiunile de cultură în care se obțin sortimentele cele mai proteice sînt cele

Tabela nr. 8

Conținutul proteic a 9 hibrizi dubli de porumb cultivați în 1960 în diferite regiuni pedoclimatice, caracterul lor proteic ereditar și cel imprimat de regiunea de cultură

Denumirea hibridului dublu		„Minhibrid 612"	„Insubria 295"	„Minhibrid 611"	„AES 204"	„Insubria 295 A"	„Embro 21"	„Maliani"	„K.A. 4"	„Embro 23"	Amplitudinea proteică a diferiților hibrizi în aceeași regiune
Caracterul proteic ereditar al hibridului / Caracterul proteic imprimat de regiune		10,92	10,98	11,14	11,15	11,28	11,69	12,23	12,44	12,88	
Turda	10,15	8,73	9,17	8,88	8,96	9,42	9,92	10,75	10,98	11,58	2,85
Săftica	11,56	11,53	11,84	11,45	10,07	11,21	12,77	13,05	12,35	12,09	2,98
Ceala	11,89	11,00	10,80	11,56	11,88	10,72	12,73	12,91	—	13,07	2,35
Fundulea	11,84	11,64	11,03	11,22	11,85	11,24	12,35	12,51	12,44	12,66	1,63
Simnic	12,93	13,10	12,15	12,91	12,97	13,14	13,37	13,71	12,74	13,68	1,56
Podul Iloaiei	13,26	12,32	12,80	13,40	13,33	13,12	13,45	13,62	13,90	14,19	1,57
Amplitudinea proteică a fiecărui hibrid în diferitele regiuni		4,37	3,63	4,52	4,37	3,72	3,53	2,96	2,92	2,61	

cuprinse pe diagonală sau sub diagonală, iar cele mai amidonoase deasupra diagonalei.

Datele din tabela nr. 8 ne arată astfel că sortimentele cele mai proteice se pot obține :

a) fie în regiunile pedoclimatice mai umede, dacă se vor cultiva varietăți al căror caracter proteic ereditar este mai mare ;

b) fie în regiunile pedoclimatice mai secetoase, dacă se vor cultiva orice varietăți, dar mai ales cele al căror caracter proteic ereditar este mai mare.

Problema obținerii unor recolte cît mai proteice este de cea mai mare însemnătate, deoarece în alimentația oamenilor lupta pentru proteine constituie problema cea mai de seamă a agriculturii actuale.

Concluziile de mai sus au fost confirmate întocmai prin cercetările pe care le-am făcut pe încă alte 29 de varietăți dublu hibride ale porumbului, cultivate în diferitele regiuni pedoclimatice ale țării [17].

Observații. În lucrarea de față am cercetat legitatea însușirilor chimice numai în cazul cînd au acționat doi din factorii care determină viața și evoluția organismului viu, și anume : variabilitatea și ereditatea. Cel de-al treilea factor al evoluției, selecția, pare că nu a acționat sau a avut o influență imperceptibilă. Dacă ar fi acționat selecția, desigur că tabloul variabilității eredității ar fi fost altul.

Catedra de chimie organică și biologică
a Institutului agronomic „N. Bălcescu", București

BIBLIOGRAFIE

1. N. M. Sisakean, *Dialectica materialistă și științele moderne*, Edit. politică, 1960 ; Probleme de filozofie, **2**, 9 (1959) și **5**, 17, (1959).
2. V. A. Engelhardt, Probleme de filozofie, **7**, 11 (1962).
3. I. Uşerson, Cercetări filozofice, **2**, 14 (1962).
4. A. V. Blagovescenschi, Bazele biochimice ale procesului de evoluție la plante, Edit. agrosilvică, București, 1953.
5. Mircea Ionescu, V. Sluşanschi, O. Popescu, Anal. I.C.A.R. 1935—1940.
6. Horia Sluşanschi, *Porumbul*, Studiu monografic, Edit. Acad. R.P.R., 1957, p. 151.
7. M. Ionescu, M. Ivănescu și M. Ferando, Probleme agricole, **6**, 13—22 (1959).
8. Mircea Ionescu, *Probleme actuale de biologie*, Edit. Acad. R.P.R., 1960, p. 95.
9. N. Săulescu și M. Ionescu, *Probleme agricole*, **4**, 20—31 (1960).
10. N. Săulescu, M. Ionescu, M. Ivănescu, M. Ferando, M. Bîrsan, Probleme agricole, **11**, 22—31 (1961).
11. N. Săulescu, M. Ionescu, M. Ivănescu, M. Ferando, M. Bîrsan, Probleme agricole, **5**, 49—56 (1962).
12. Mircea Ionescu, N. N. Săulescu, M. Ivănescu, M. Bîrsan, St. cerc. biochim, **4**, 485 (1961).
13. M. Ionescu, N. Săulescu, M. Ivănescu, M. Ferando, M. Bîrsan, Lucr. șt. Inst. agr. „N. Bălcescu", București, 129—135 (1960).
14. T. Crăciun, M. Ionescu, A. Ciofu, M. Ivănescu, M. Ferando, M. Visarion și I. Bîrnaure, Lucr. șt. Inst. agr. „N. Bălcescu", București (1963).
15. Mircea Ionescu, S. Ionuț-Caragiani, Rev. roum. chimie, **4**, 331 (1964).
16. Mircea Ionescu, Teofil Crăciun et A. Ciofu, Rev. roum. chimie, **5**, 389 (1964).
17. Mircea Ionescu, N. Săulescu, Lucr. șt. Inst. agr. „N. Bălcescu", București (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 17–31 (1965)

CERCETĂRI POLAROGRAFICE ASUPRA PROTEINELOR DIN PLASMA SEMINALĂ
II. ACȚIUNEA PERIODATULUI ȘI A HIDROXILAMINEI ASUPRA PROTEINELOR PLASMATICE *

L. M. BURUIANĂ și V. PAVLU

662.62:53

Rezumat. — Analiza polarografică a proteinelor din plasma seminală pune în evidență unele particularități ale acestora. Determinînd activitatea polarografică a diferitelor categorii de proteine înainte și după acțiunea periodatului de sodiu și a hidroxilaminei în mediu alcalin rezultă că glucidele legate joacă un anumit rol în determinarea conformației spațiale a lanțului polipeptidic.

Legătura grupărilor glucidice poate fi și de natură esterică. Modul de legătură și natura grupărilor glucidice sînt factorii principali care produc diversitatea calitativă a proteinelor din plasma seminală.

Fracțiunea glucopeptidică solubilă în acid tricloracetic a plasmei seminale de taur se repartizează la 2 tipuri distincte, reglementate genetic, fapt care prezintă importanță în procesul de selecție.

Compoziția și structura proteinelor din spermă este incomplet cunoscută. Merită să fie subliniat unul dintre caracterele esențiale, și anume conținutul lor ridicat în glucide legate [3], constituit mai ales din hexozamină și acid sialic. Asupra modului de legătură dintre grupările glucidice și partea proteică se cunoaște foarte puțin. Conjugarea glucidelor cu proteinele conferă acestora anumite proprietăți, cea mai importantă fiind aceea că le protejează contra denaturării fizice și chimice, mărindu-le solubilitatea în solvenții polari și nepolari. De aceea proteinele din plasma seminală sînt greu precipitabile de către acizi organici (acidul tricloracetic, acidul sulfosalicilic etc.) și minerali (acidul percloric și metafosforic nici nu le precipită), utilizați de obicei în acest scop. După cum semnalează K. A. Abraham și P. M. Bhargava [1] și după cum ne-am putut convinge, proteinele plasmei seminale precipitate cu acid tricloracetic nu sînt denaturate și pot fi ușor readuse în soluție prin dializă. O altă particularitate a acestor proteine este că însușirile lor variază în limite largi cu specia. Faptul a putut fi pus în evidență în mod categoric cu ajutorul analizei polarografice [2].

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **2**, 1, 1965, în limba franceză.

Ţinînd seama că proteinele plasmei seminale joacă un rol important în procesele de spermiogeneză, fecundaţie şi selecţie, ele merită să fie cercetate cu atenţie. Unele rezultate obţinute deja cu ajutorul metodei polarografice [4], [5], [6], [8] au demonstrat că aceasta constituie un mijloc potrivit pentru diferenţierea şi analiza proteinelor din plasma seminală.

În lucrarea de faţă s-a cercetat cu ajutorul acestei metode influenţa grupărilor glucidice asupra activităţii polarografice a proteinelor plasmei seminale cu scopul de a lămuri printre altele şi modul de legătură al acestora de gruparea polipeptidică.

MATERIAL ŞI METODE DE LUCRU

Plasma seminală se obţine cît mai repede după recoltare prin centrifugare timp de 15 min. cu viteza de 3 000 t/min. După separarea de sediment se păstrează în fiole sterile la rece (+ 4°). Nu se utilizează niciodată plasmă mai veche de 24 de ore. Sperma provenea de la animale sănătoase din diferite centre de recoltare şi care erau utilizate în mod curent în practica însămînţărilor artificiale.

Activitatea polarografică a proteinelor se determină în soluţia suport a lui Brdicka (Co^{3+}) cu ajutorul polarografului Heyrovsky tip N-301. Parametrii polarografici erau aceiaşi în toate determinările făcute pentru a permite comparaţia rezultatelor obţinute. S-a determinat activitatea polarografică a proteinelor totale din plasma seminală şi a următoarelor fracţiuni separate după cum urmează :

— proteine precipitabile cu acid tricloracetic (ATA). Acestea se separă diluîndu-se plasma seminală în raportul 1 : 5 cu ser fiziologic şi adăugînd apoi 5 ml ATA 10 %. Se lasă totul 1 oră în gheaţă şi apoi se centrifughează. Se spală precipitatul de două ori cu ATA 5 %. Pentru polarografiere, precipitatul se dizolvă în 1 ml NaOH N/10.

— supernatantul sau filtratul tricloracetic conţine glucopeptidele solubile în ATA ;

— fracţiunea seromucoidului, denumită astfel prin analogie cu cea din sînge, deoarece se obţine la fel din filtratul tricloracetic prin precipitare cu acid fosfotungstic. Se adaugă în acest scop peste 5 ml filtrat tricloracetic, 1 ml acid fosfotungstic 5 % în HCl 2 N. Precipitatul se separă prin centrifugare şi apoi se spală de 2 ori cu ser fiziologic care conţine 2 % acid fosfotungstic.

Precipitatul se dizolvă după aceea în NaOH N/10, adăugîndu-se pentru completă clarificare 1 picătură de NaOH N/1.

În fiecare dintre soluţiile obţinute ca mai sus se determină conţinutul în proteină cu reactivul lui Folin conform tehnicii lui G. L. Miller [10], utilizîndu-se ca etalon globulina din serul de bou. Pentru a cerceta rolul grupărilor glucidice, se determină activitatea polarografică a diferitelor fracţiuni menţionate mai sus, înainte şi după tratare cu periodat de sodiu şi hidroxilamină alcalină (pH 8).

I. *Oxidarea cu periodat de sodiu.* Peste 0,2 ml plasmă seminală sau 1 ml filtrat tricloracetic neutralizat etc. se adaugă 1 ml soluţie proaspătă de periodat de sodiu 0,1 M (2,15 g %). Se lasă la temperatura camerei (22°) un timp variabil (între 2 şi 12 ore).

După aceea se măsoară activitatea polarografică. Se determină şi activitatea polarografică a soluţiei martor (m), care era pregătită la fel cu apă distilată în locul soluţiei proteice.

II. *Hidroxilaminoliza.* Derivaţii acizilor carboxilici şi în special esterii reacţionează cu hidroxilamina cu formarea de acizi hidroxamici. Esterii aminoacizilor, amidele, derivaţii

N-acilaţi şi chiar glucopeptidele în care legătura dintre glucide şi lanţul peptidic se face esteric pot fi descompuşi, hidroxilaminoliza debutînd în mediu alcalin prin atacul nucleofil al grupării NH_2O^- asupra acestor legături. Intensitatea hidroxilaminolizei depinde de pH, de temperatura şi de durata reacţiei.

În cazul nostru ea s-a executat astfel : peste 0,2 ml plasmă seminală se adaugă 1 ml de soluţie de hidroxilamină neutră (din soluţia preparată amestecînd 1 ml hidroxilamină clohidrică 2M cu 0,7 ml KOH 3N), 0,7 ml KOH 3 N şi 0,9 ml $NaHCO_3$ 2,5% (pH final 8). Se lasă la temperatura dorită un timp variabil (între 2 şi 12 ore). În cazul filtratului tricloracetic, acesta se neutraliza mai înainte de efectuarea hidroxilaminolizei.

REZULTATELE OBŢINUTE

1. Activitatea polarografică a filtratului tricloracetic din plasma seminală de taur (taurul Eufrat).

După cum se vede din figura 1, activitatea polarografică a glucopeptidelor solubile în ATA este mult mai mare decît a proteinelor native din plasma seminală.

Există însă şi o altă categorie de animale la care activitatea filtratului este mai mică decît a proteînelor plasmatice (taurul Pius, fig. 2).

Aceste două tipuri se deosebesc şi după modul de comportare la iradierea cu raze energetice (raze gamma emise de ^{60}Co) de mică intensitate. Pe cînd în primul caz iradierea produce o sporire a activităţii polarografice, cu creşterea puterii suprimante (fig. 3), în al doilea caz iradierea produce o scădere a activităţii, cu micşorarea puterii suprimante (fig. 4).

S-a constatat că acest caracter este ereditar şi determinat genetic, ceea ce prezintă interes practic.

2. Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei alcaline. Aceasta se manifestă în cazul proteinelor din plasma seminală prin scăderea rapidă şi masivă a activităţii polarografice (fig. 5).

Rezultă că gruparea glucidică joacă un rol important în stabilirea configuraţiei moleculei proteice (vezi la „Discuţii").

Acţiunea hidroxilaminei este mult mai slabă, decît a IO_4^{-4} după cum se vede din aceeaşi figură. Ea se accentuează însă cu temperatura (fig. 6).

3. Activitatea polarografică a precipitatului obţinut cu ATA.

Există o mare asemănare între modul de comportare a proteinelor native din plasma seminală de taur şi precipitatul cu ATA (fig. 7).

Reiese că, în acest caz, majoritatea proteinelor plasmatice sînt precipitate cu ATA. Faptul este confirmat şi de modul cum se comportă în urma acţiunii periodatului şi a hidroxilaminei (fig. 8).

4. Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra fracţiunii glucopeptidice solubile în ATA. Se vede că în ambele cazuri ea este aproape nulă (fig. 9), ceea ce sugerează anumite ipoteze cu privire la mărimea şi structura glucopeptidelor solubile în ATA (vezi la „Discuţi").

5. Modul de comportare a proteinelor din sperma de vier. Aceasta se caracterizează printr-un conţinut redus de proteine şi prin însuşirea de a coagula sub acţiunea coagulazei din veziculele seminale (veziculaza). Ca şi în cazul plasmei seminale de taur, proteinele conţinute sînt polaro-

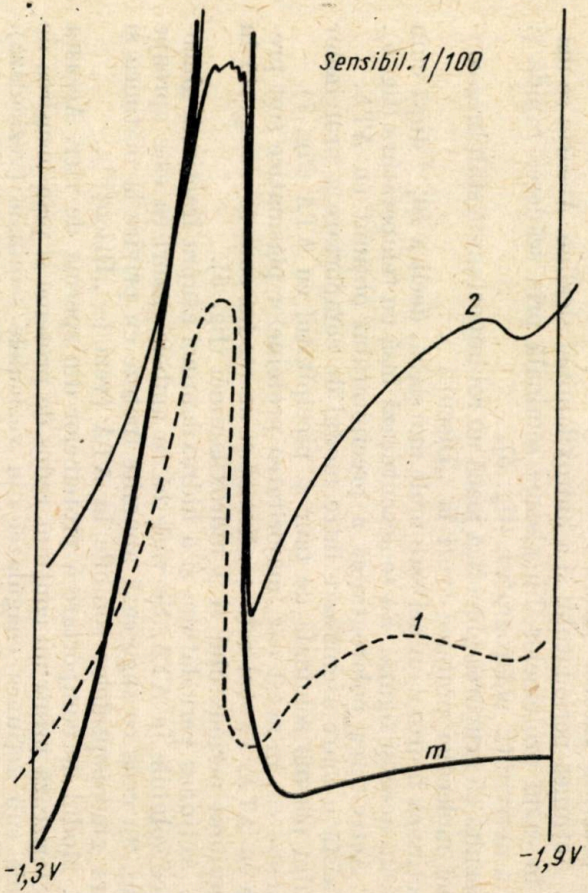


Fig. 1.—Activitatea polarografică a proteinelor din plasma seminală și a glucopeptidelor din filtratul tricloracetic (ATA). Taur Eufrat.

Curba 1, Plamsa seminală. Curba 2, Filtratul tricloracetic. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină: 0,58 mg%.

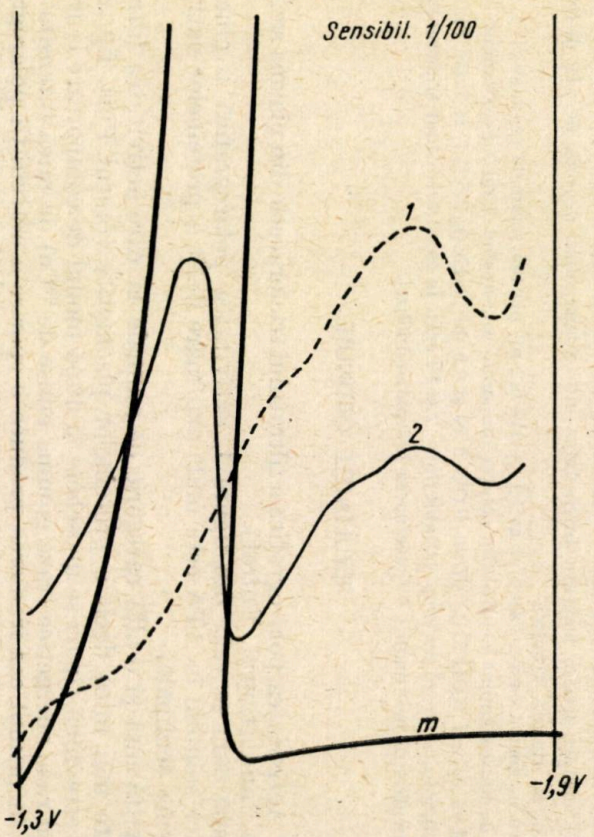


Fig. 2.—Activitatea polarografică a proteinelor din plasma seminală și a glucopeptidelor din filtratul triclor-acetic. Taur Pius.

Curba 1, Plasma seminală. Curba 2, Filtratul tricloracetic. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină: 0,33 mg%.

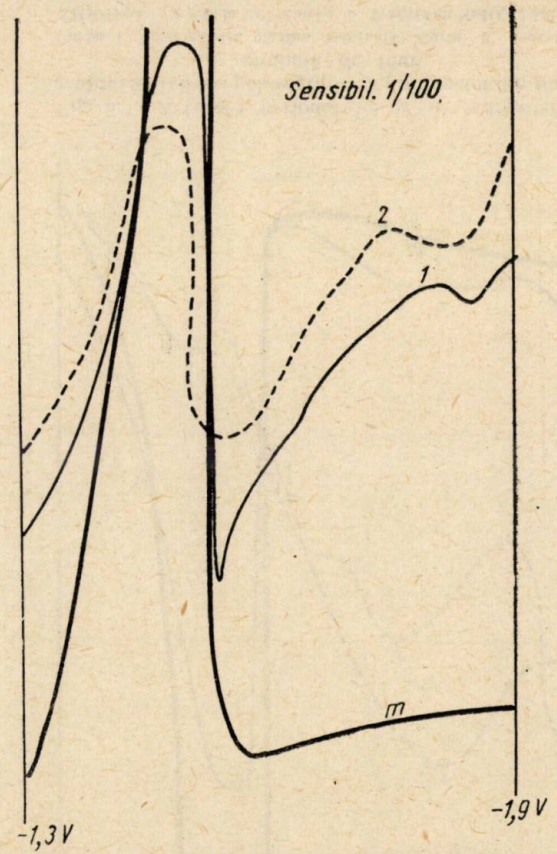


Fig. 3. — Influența iradierii cu raze gamma (^{60}Co) asupra glucopeptidelor din filtratul ATA. Taur Eufrat. Curba 1, Înainte de iradiere. Curba 2, După iradiere cu doza de 16 mR. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină : 0,58 mg%.

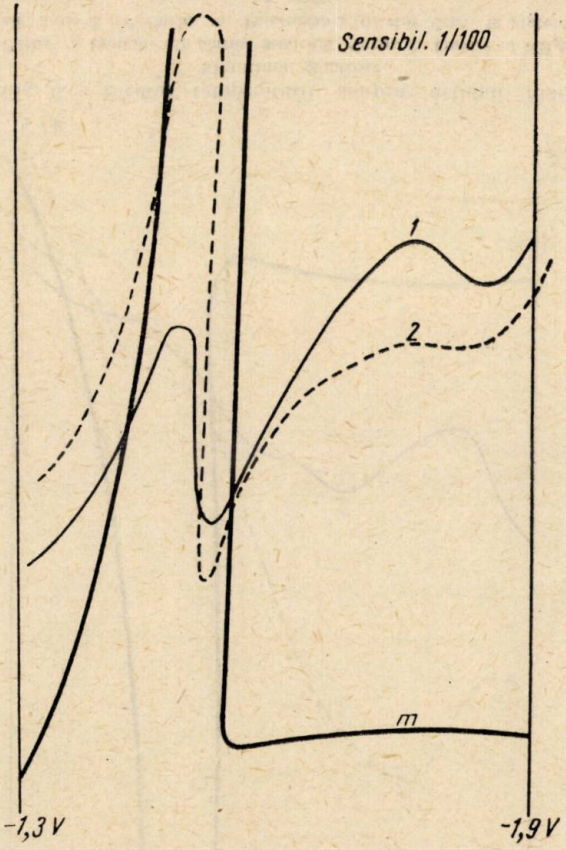


Fig. 4. — Influența iradierii cu raze gamma (^{60}Co) asupra glucopeptidelor din filtratul cu ATA. Taur Pius. Curba 1, Înainte de iradiere. Curba 2, După iradiere cu doza de 16 mR. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină : 0,66 mg%.

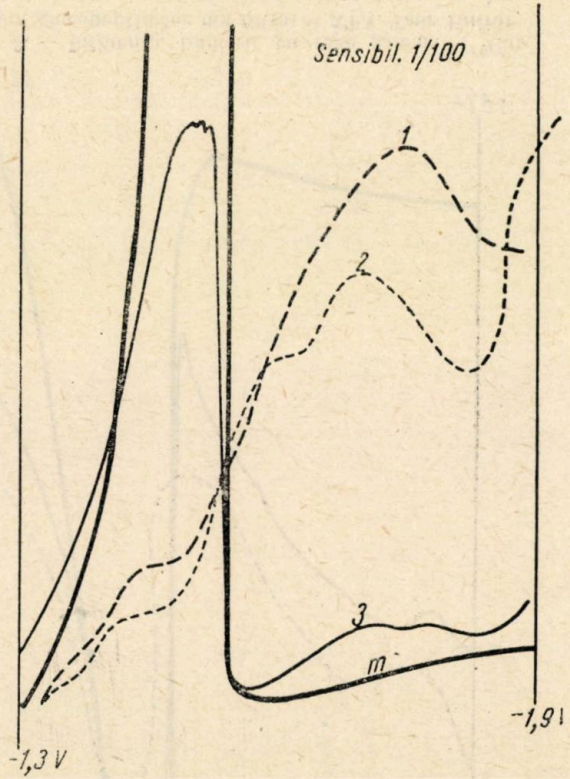


Fig. 5. — Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra activităţii polarografice a proteinelor din plasma seminală de taur.

Curba 1, Proteine din plasma seminală. Curba 2, Tratate cu NH_2OH-alc., 2 ore la 22°. Curba 3, Tratate cu $NaIO_4$, 2 ore la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină: 4,6 mg %.

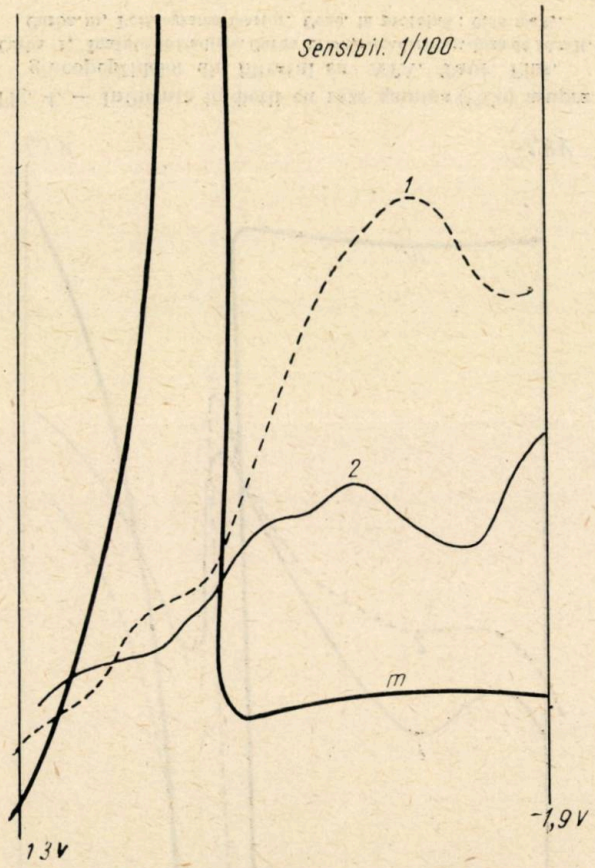


Fig. 6. — Efectul temperaturii asupra acţiunii hidroxilaminei alcaline.

Curba 1, Proteine din plasma seminală. Curba 2, Tratate cu NH_2OH alc. 2 ore la 50°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină: 4,6 mg%.

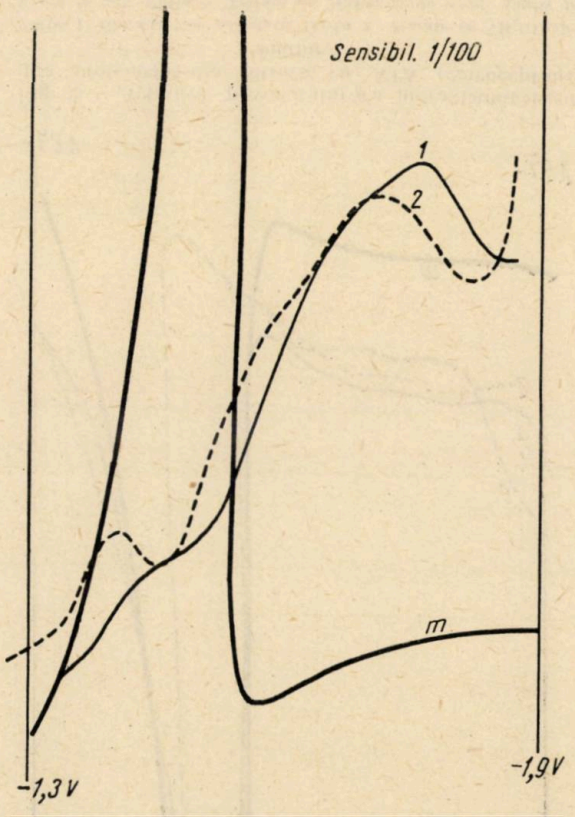


Fig. 7. — Comparaţie între activitatea polarografică a proteinelor din plasma seminală de taur şi a fracţiunii precipitate cu ATA.

Curba 1, Proteinele native. Curba 2, Aceleaşi, precipitate cu ATA şi redizolvate în $NaOH$. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină: 4,3 mg%.

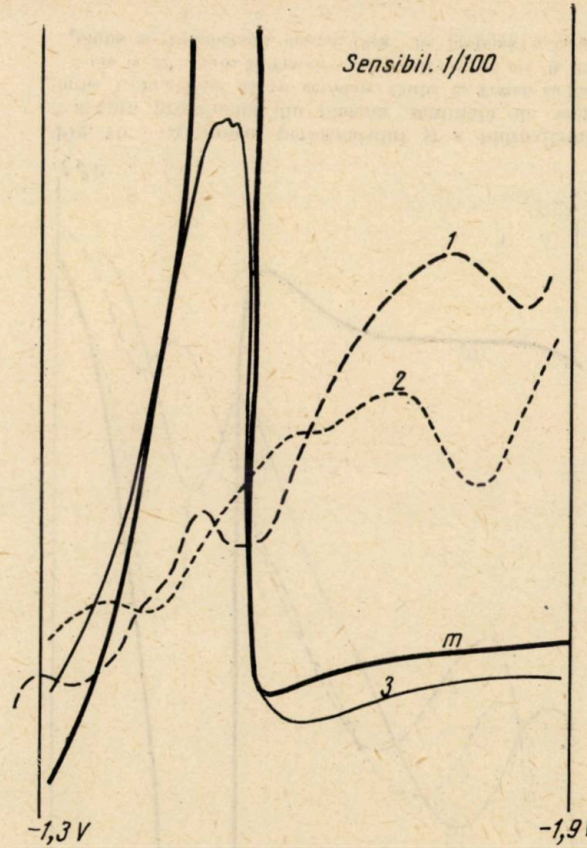


Fig. 8. — Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra proteinelor din plasma seminală de taur, precipitate cu ATA şi redizolvate în NaOH.

Curba 1, Proteine netratate. Curba 2, Tratate cu NH_2OH-alc. 2 ore la 22°. Curba 3, Tratate cu $NaIO_4$. 2 ore la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină: 4,3 mg%.

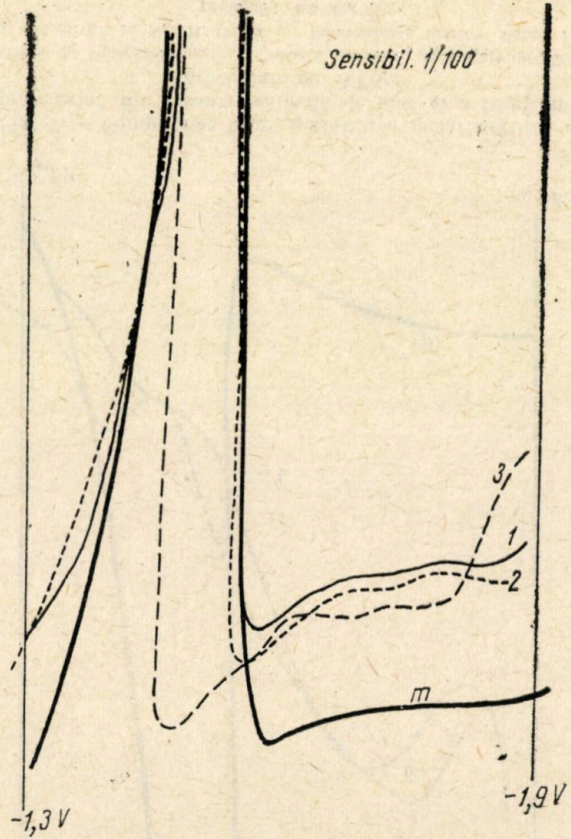


Fig. 9. — Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra proteinelor din filtratul cu ATA (glucopeptidele solubile).

Curba 1, Glucopeptide netratate. Curba 2, Tratate cu NH_2OH-alc., 2 ore la 22°. Curba 3, Tratate cu $NaIO_4$, 2 ore la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină : 0,25 mg %.

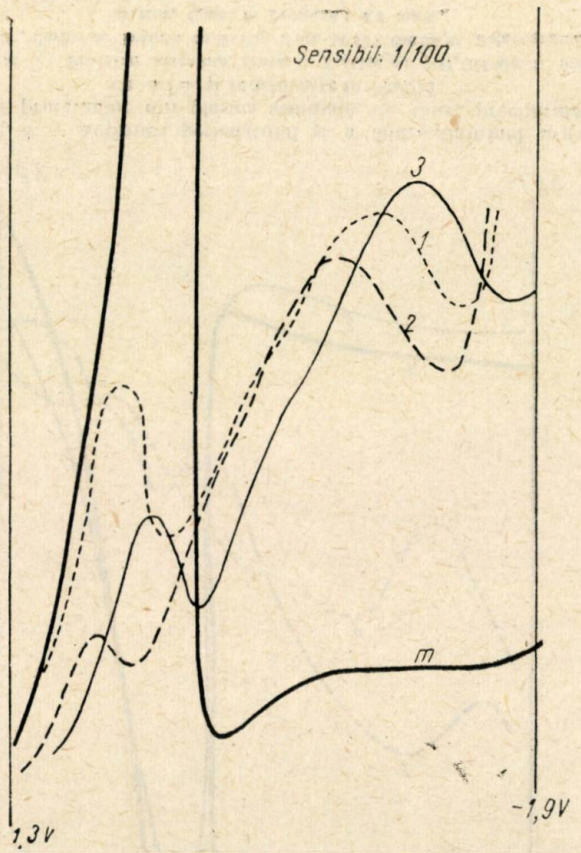


Fig. 10. — Acţiunea perioadatului şi a hidroxilaminei asupra proteinelor din plasma seminală de vier.

Curba 1, Proteinele native netratate. Curba 2, Tratate cu $NaIO_4$, 2 ore la 22°. Curba 3, Tratate cu NH_2OH-alc., 2 ore la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină : 2,5 mg %.

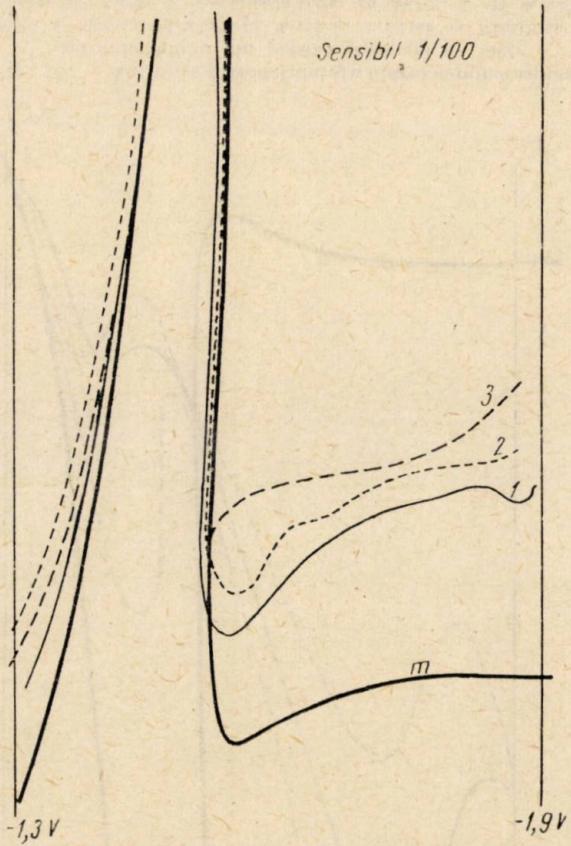


Fig. 11. — Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra glucopeptidelor solubile în ATA din plasma seminală de vier.

Curba 1, Glucopeptide netratate. Curba 2, Tratate cu NH_2OH-alc. 2 ore la 22°. Curba 3, Tratate cu $NaIO_4$, 2 ore la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină: 0,17 mg%.

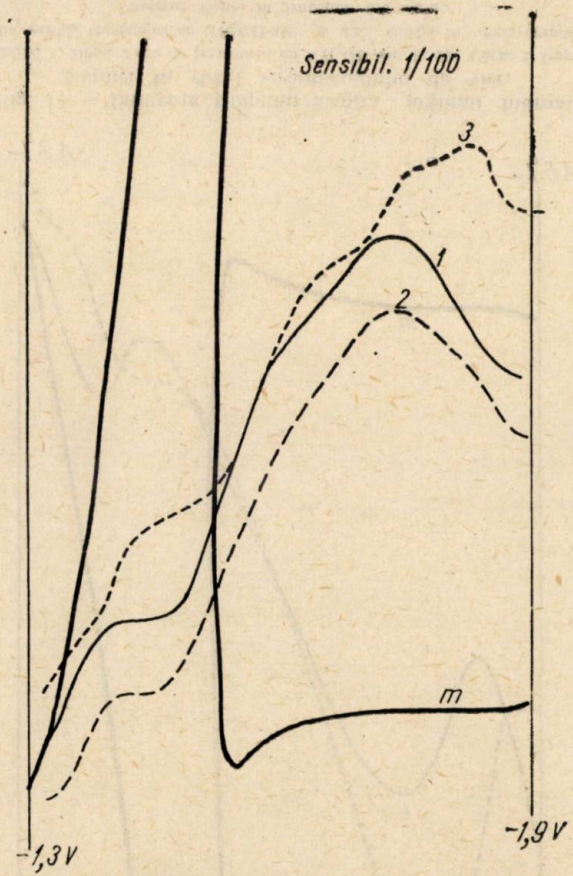


Fig. 12. — Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra proteinelor din plasma seminală de vier precipitate cu ATA şi redizolvate în NaOH.

Curba 1, Proteine netratate. Curba 2, Tratate cu NH_2OH-alc. 2 ore la 22°. Curba 3, Tratate cu $NaIO_4$, 2 ore la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc, în proteină: 4,2 mg%.

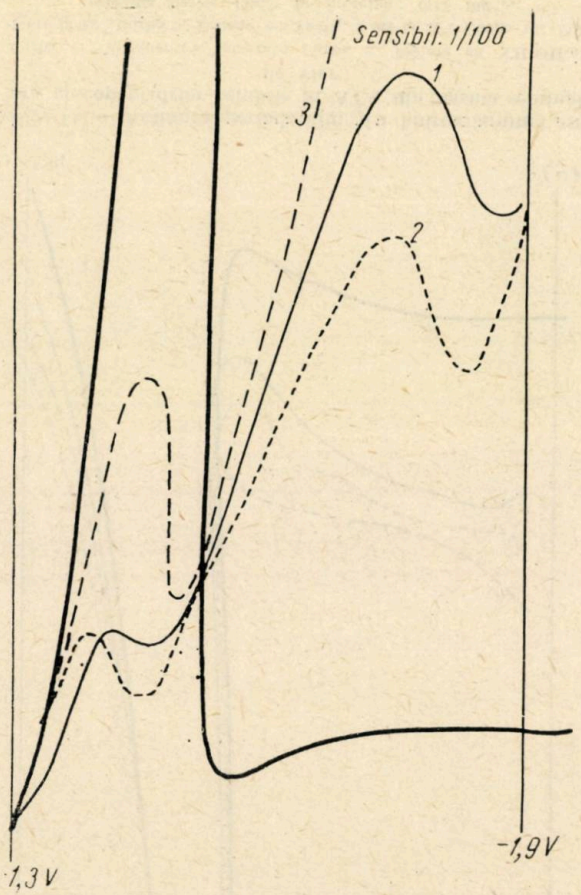


Fig. 13. — Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra seromucoidului din plasma seminală de vier.

Curba 1, Seromucoid. Curba 2, Seromucoid tratat cu NH_4OH-alc., 2 ore la 22°. Curba 3, Seromucoid tratat cu $NaIO_4$. 2 ore la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină : 3,3 mg%.

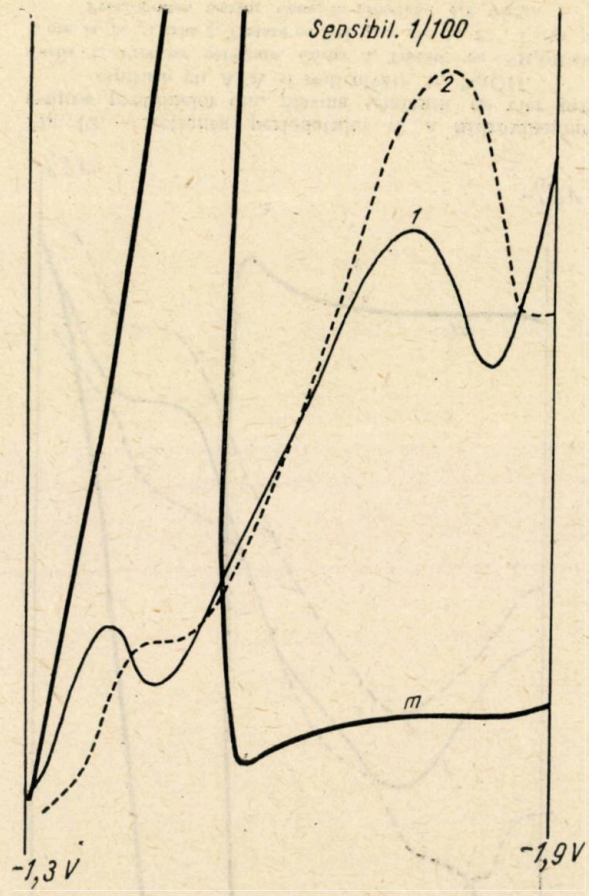


Fig. 14. — Influenţa timpului asupra acţiunii hidroxilaminei în cazul seromucoidului de vier.

Curba 1, După 2 ore de tratament cu NH_2OH-alc. la 22°. Curba 2, După $4\frac{1}{2}$ ore de tratament cu NH_2OH-alc. la 22°. Curba m, Polarograma martor. Conc. în proteină : 3,3 mg%.

active. Se deosebesc însă categoric de acestea prin faptul că, sub influența periodatului și a hidroxilaminei, activitatea lor polarografică aproape că nu se modifică (fig. 10).

Din contra, în cazul glucopeptidelor solubile în ATA acești reactivi au o acțiune activatoare (fig. 11).

După cum se va discuta mai departe, faptul are implicații importante, care privesc modul de legătură a glucidelor de lanțul polipeptidic.

6. Acțiunea periodatului și a hidroxilaminei asupra precipitatului obținut cu ATA din plasma seminală de vier. Spre deosebire de cazul taurului, periodatul mărește activitatea polarografică a acestor proteine, pe cînd hidroxilamina o deprimă foarte puțin (fig. 12).

7. Acțiunea periodatului și a hidroxilaminei asupra seromucoidului din plasma seminală de vier. Comportarea este identică cu cea din cazul precedent (fig. 13).

Aceasta ne îndreptățește să presupunem că diferența dintre seromucoid și proteinele native se datorește în acest caz numai conținutului diferit în glucide. Faptul este sprijinit și de constatarea că acțiunea prelungită a hidroxilaminei face să crească activitatea polarografică (fig. 14).

Rezultă că unele grupări glucidice erau legate esteric de lanțul polipeptidic și că ele ecranau în oarecare măsură grupările prototropice ale seromucoidului.

DISCUȚII

În conformitate cu ipoteza făcută [7] și verificată în diferite ocazii, activitatea polarografică a proteinelor se datorește unor grupări chimice, denumite prototropice, a căror structură electronică conferă o mobilitate crescută hidrogenului în prezența metalelor tranziționale, în special a cobaltului. Acest fapt se manifestă prin apariția așa-ziselor trepte catalitice proteice, variații discontinue ale curentului de difuziune din jurul electrodului picător cu mercur. Forma și înălțimea treptelor catalitice dau indicații cu privire la compoziția și structura macromoleculelor proteice. Capacitatea de a reduce maximul cobaltului (puterea suprimantă) orientează asupra intensității forțelor interfaciale ale proteinei respective din soluția cercetată, însușire strîns legată de aranjamentul tridimensional al lanțurilor polipeptidice. Grupările prototropice pot fi mai mult sau mai puțin ecranate sau modificate din punct de vedere chimic, ceea ce provoacă schimbarea activității polarografice.

S-a utilizat de aceea această metodă în prezenta lucrare pentru obținerea de informații cu privire la structura proteinelor din plasma seminală. Am presupus că glucidele care intră în cantitate apreciabilă în compoziția acestor proteine joacă un rol important în determinarea activității polarografice și, invers, activitatea polarografică poate da indicații asupra aranjamentului macromolecular al acestora. S-a cercetat de aceea modul cum variază activitatea polarografică după tratarea cu periodat de sodiu, reactiv specific al glucidelor. Se constată că, într-adevăr, periodatul modifică activitatea polarografică a diferitelor fracțiuni separate din plasma

Fig. 15. — *Configurația ipotetică a lanțurilor polipeptidice în cazul glucoproteinelor din plasma seminală.*

SCHEMA I. — *Glucoproteinele din plasma seminală de porc.*
Distribuția grupărilor glucidice de-a lungul unui lanț polipeptidic consolidează aranjamentul macrmolecular al proteinelor respective (situația din A). În urma acțiunii periodatului de sodiu se produce oxidarea glucidelor și ruperea catenei hidrocarbonate a acestora. Rigiditatea grupărilor glucidice se micșorează, iar în lanțul polipeptidic se contractă, ecranînd o parte din grupările polaractive „e" (situația din B). Activitatea palarografică scade, după cum se constată experimental.

SCHEMA II. — *Glucoproteinele din plasma seminală de vier.*
Grupările glucidice nu mai sînt repartizate de-a lungul întregului lanț polipeptidic. Ele intervin în mică măsură la consolidarea structurală a lanțului polipeptidic. De aceea tratarea cu acid periodic modifică foarte puțin activitatea polarografică. Schemele de mai sus pot explica și modul de acțiune a hidroxilaminei în mediu alcalin, demonstrînd că grupările glucidice pot fi legate de lanțul polipeptidic și esteric.

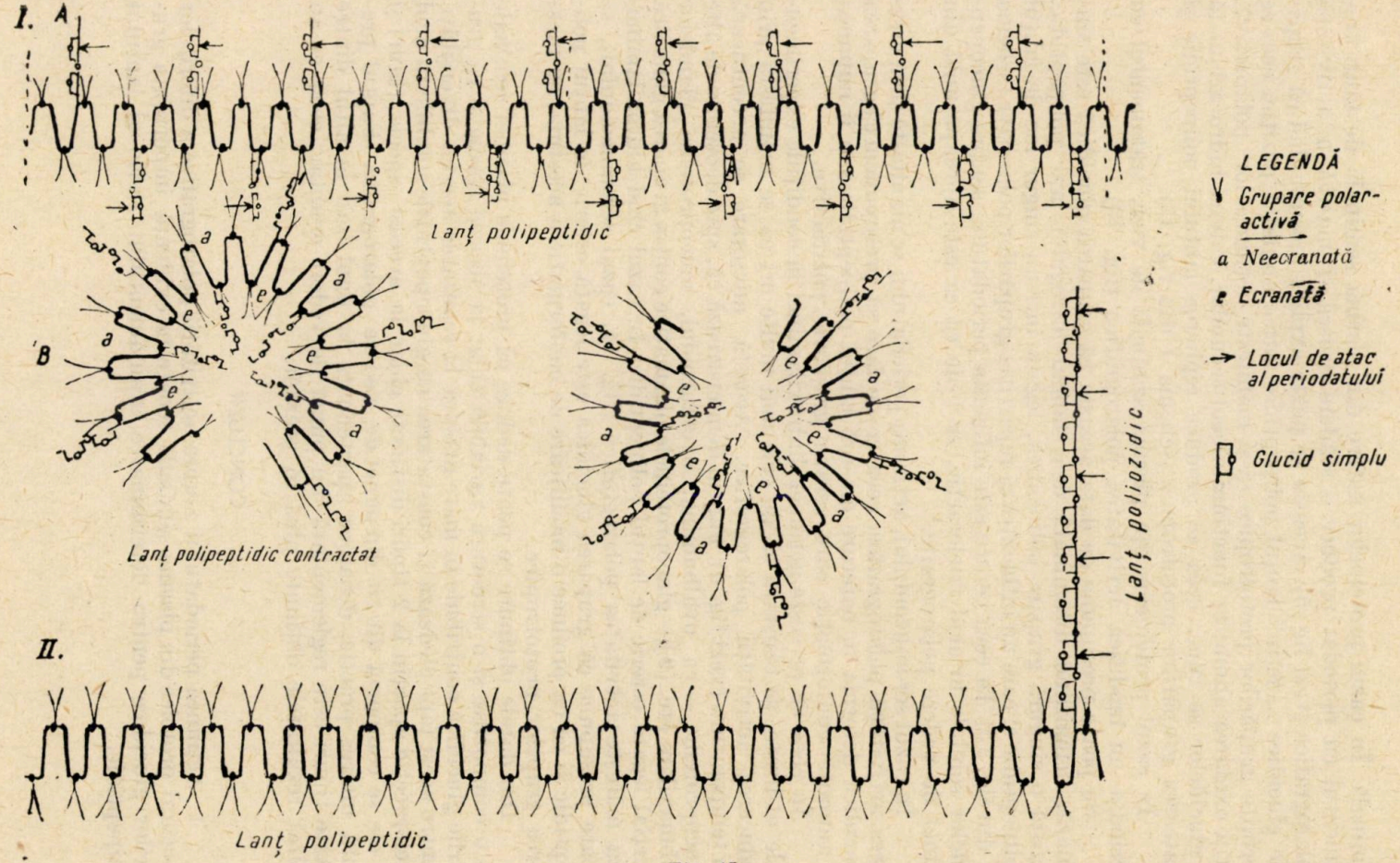

I. A
Lanț polipeptidic
B
Lanț polipeptidic contractat
Lanț poliozidic
II.
Lanț polipeptidic
LEGENDĂ
Grupare polar-activă
a Neecranată
e Ecranată
Locul de atac al periodatului
Glucid simplu

Fig. 15

seminală. În cazul proteinelor native din plasma seminală de taur, tratamentul cu periodat produce o scădere bruscă şi masivă a activităţii polarografice (vezi fig. 5). Aceasta se poate explica presupunînd că grupările glucidice „susţin" lanţul polipeptidic într-o anumită poziţie, ceea ce permite grupărilor prototropice să-şi manifeste acţiunea lor polaractivă. Prin oxidarea anumitor funcţiuni alcool secundar, catena hidrocarbonată a glucidelor se rupe, ceea ce produce replierea lanţului polipeptidic şi mascarea grupărilor prototropice (schema I din fig. 15).

În cazul proteinelor din plasma seminală de vier, tratamentul cu periodat nu modifică activitatea polarografică (fig. 10).

Se poate presupune de data aceasta că gruparea glucidică este singulară, nemaifiind diseminată de-a lungul întregului lanţ polipeptidic. Există o singură grupare poliozidică, legată într-un singur loc de lanţul polipeptidic şi care nu influenţează repartiţia grupărilor polarative (schema II din fig. 15). În ceea ce priveşte influenţa periodatului asupra glucopeptidelor solubile în acid tricloractic, se vede că ea este aproape nulă din punct de vedere polarografic.

În cazul seromucoidului, acţiunea periodatului se manifestă prin creşterea activităţii polarografice, ceea ce ne face să presupunem că gruparea glucidică deforma în oarecare măsură lanţul polipeptidic sau îi impunea o anumită conformaţie care ecrana grupările polaractive.

În ceea ce priveşte acţiunea hidroxilaminei în condiţiile experimentale utilizate, se constată că de cele mai multe ori ea se manifestă prin reducerea activităţii polarografice. Această micşorare se accentuează cu temperatura (vezi fig. 6). Faptul demonstrează că, spre deosebire de alte mucoproteine — ca ovalbumina, ovomucoidul, mucoproteina glandelor submaxilare etc. [9],—glucoproteinele plasmatice conţin gruparea glucidică parţial legată esteric de lanţul polipeptidic. În cazul cînd hidroxilaminoliza măreşte actvitatea polarografică (fig. 14, cazul seromucoidului), se poate presupune că gruparea glucidică este legată esteric de lanţul polipeptidic şi că ea produce o modificare de conformaţie a acestuia, cu mascarea grupelor prototropice.

Din datele obţinute se poate deduce că proteinele plasmei seminale au o compoziţie şi o structură variabilă chiar la aceeaşi specie şi că grupările glucidice contribuie în mare măsură la realizarea acestei diversităţi. Pentru acest fapt pledează şi constatarea că glucopeptidele solubile în acid tricloracetic aparţin la 2 tipuri distincte chiar la aceeaşi specie (taur) şi că ele se comportă diferit din punct de vedere polarografic. Faptul prezintă interes practic, deoarece apartenenţa la unul sau la altul dintre aceste tipuri este reglementată din punct de vedere ereditar, ceea ce au arătat rezultatele obţinute pînă în prezent.

CONCLUZII

1. Acţiunea periodatului asupra activităţii polarografice a diferitelor fracţiuni proteice din plasma seminală scoate în evidenţă importanţa grupărilor glucidice pentru determinarea aranjamentului steric al lanţului polipeptidic.

2. Acțiunea hidroxilaminei alcaline asupra activității polarografice ale acelorași proteine demonstrează că grupările glucidice care intră în compoziția lor sînt legate uneori și prin legături de tip esteric.

3. Comportarea polarografică a glucopeptidelor solubile în acid tricloracetic demonstrează existența a două tipuri distincte de proteine în cazul plasmei seminale de taur. Rezultă că biosinteza lor este controlată de factori genetici, ceea ce deschide noi perspective în procesul de selecție la această specie.

Catedra de chimie biologică,
Facultatea de medicină veterinară, București

Prezentată la redacție la 1 august 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Abraham K. A., P. M. Bhargava, *Some studies on the trichloracetic precipitated proteins of seminal plasma in the bull, buffalo and goat*, J. Reprod. & Fertility, **5**, *2*, 277 (1963).
2. Buruiană L. M. et Pavlu V., *Le comportement polarographique du sperme*, Naturwiss, **44**, *22*, 589 (1957).
3. Buruiană L. M. et Hadarag El., *Sur les glucides liés du plasma séminal*, Naturwiss, **49**, *13*, 303 (1962).
4. Buruiană L. M., Hadarag El. și Pavlu V., *Cercetări cu privire la proteinele din plasma seminală*, St. cerc. biochim., **5**, *4*, 507 (1962).
5. Buruiană L. M. și Pavlu V., *Activitatea polarografică a proteinelor din plasma seminală*. Com. Conferința a III-a internațională despre „Biologia și patologia reproducției la animalele domestice", București, sept. 1963.
6. Buruiană L. M. i Hadarag El., *Vyznam niektorych zloziek semmenny plazmy pre hodnotenie kvality spermu*, III Vedecku Konferenciu, 20—21 iunie 1963, Kosice.
7. Buruiană L. M. și Pavlu V., *Aplicațiile metodei polarografice în studiul proteinelor*, Studia Univ. „Babeș-Bolyai", Ser. chim., fasc. 1, 377 (1963).
8. Buruiană L. M., Hadarag El. și Bărbulescu I., *Calitatea proteinelor plasmei seminale*, St. cerc. biochim., **7**, *2*, 165 (1964).
9. Harbon S., G. Herman-Boussier et H. Clauser, *Etude des liaisons entre sucres et acides aminés dans les glycoprotéines au moyen de l'hydroxylaminolyse*. I et II Comm. Bull. Soc. Chim., Biol. **45**, *12*, 1267 et 1279 (1963).
10. Miller G. L., *Protein determination for large numbers of samples*, Anal. Chem., **31**, *5*, 964 (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 33–41 (1965)

NECESARUL DE VITAMINĂ C LA MUNCITORII EXPUȘI LA MERCUR

V. COMES, V. GALEA, MARGARETA WEINLICH și D. SUCIU,
în colaborare cu CLARA VALACZKAI, FELICIA VLAD și I. DÉNES

577.1

Rezumat. — Pe un lot de 35 de muncitori proveniți din secția de electroliză (noxa principală mercur) a unei uzine de produse chimice, s-a urmărit stabilirea necesarului de vitamină C în perioada de primăvară timpurie (martie—aprilie). Lotul de control s-a constituit dintr-un grup de 30 de muncitori proveniți dintr-o fabrică de confecții. Pe baza rezultatelor obținute putem formula următoarele concluzii:

1. Trebuințele de acid ascorbic ale unui grup de muncitori care lucrează în mediu cu mercur sînt mărite, în comparație cu un grup de muncitori neexpuși.
2. În perioada martie—aprilie, aceste trebuințe se constată a fi aproximativ de 200 mg acid ascorbic pe zi.
3. Cercetările efectuate ridică ipoteze interesînd îndeaproape mecanismul de acțiune a metalelor grele, în corelație cu sistemele enzimatice și cu unele vitamine, sub rezerva unor cercetări confirmative.

În ultimul timp am cercetat evoluția sezonieră a eliminării urinare, spontană și provocată, de acid ascorbic la un lot de muncitori dintr-o uzină de produse chimice [2], [3]. Din analiza rezultatelor a reieșit că, în perioada de toamnă (septembrie — octombrie), starea de nutriție ascorbică, apreciată în raport cu intensitatea eliminării urinare, era satisfăcătoare; în schimb, în perioada de sfîrșit de iarnă și de primăvară timpurie (februarie — martie), nivelul scăzut al ascorbinuriei, atît al celei provocate (după o încărcare cu 1,0 g acid ascorbic) cît și, mai ales, al celei spontane atrăgea atenția asupra unui anumit grad de deficit ascorbic.

Acest deficit a fost interpretat ca fiind determinat în primul rînd de aportul redus de acid ascorbic alimentar în această perioadă a anului (40—60 mg vit. C pe zi) și în al doilea rînd, probabil, de contactul permanent al muncitorilor respectivi cu mici cantități de substanțe toxice, ceea ce, după investigațiile mai noi, ar reprezenta un factor care determină creșterea trebuințelor de vit. C ale organismului.

În cercetările efectuate anterior în uzina chimică respectivă am observat că muncitorii din secția de electroliză se caracterizau prin valori foarte mici ale ascorbinuriei spontane și provocate, în comparație cu celelalte secții ale uzinei. Această observație ne-a determinat să urmărim mai temeinic acest aspect și să încercăm să răspundem la întrebarea: în ce

măsură contactul cronic cu mercurul — noxa principală din secţia de electroliză — măreşte sau nu trebuinţele de acid ascorbic ale muncitorilor expuşi. Pentru a răspunde la această întrebare, am întreprins o cercetare specială, în completarea investigaţiilor anterioare, pe care o prezentăm mai jos.

METODA DE LUCRU

Pentru a avea date comparabile, am aplicat metoda recomandată de Gonţea şi colaboratori [4] care, în cursul anului 1962, au făcut cercetări privind trebuinţele de vit. C ale muncitorilor expuşi la plumb. Am selecţionat un lot de muncitori sănătoşi, în majoritate tineri (25—35 de ani), avînd cel puţin 2 ani vechime la locuri de muncă caracterizate prin eliminări de vapori de mercur. Efectul expunerii s-a controlat prin determinarea concentraţiei de mercur din urină. Cercetările s-au desfăşurat în perioada cînd disponibilul alimentar de vit. C era cel mai redus (februarie—aprilie); mărimea aportului alimentar de vit. C s-a apreciat pe baza anchetei în cantină şi familie. Alegerea perioadei de aport ascorbic alimentar minim prezintă cel puţin două avantaje considerabile: în primul rînd unul de ordin tehnic-metodologic, şi anume acela de a se putea observa trecerea de la starea de deficit ascorbic la starea de saturaţie (vezi mai jos), în al doilea rînd unul de ordin practic, şi anume acela de a se putea stabili trebuinţele *maxime* de acid ascorbic ale categoriei de muncitori aflaţi în observaţie.

Ca indicatori ai stării de nutriţie ascorbică s-au folosit: ascorbinemia, ascorbinuria spontană şi ascorbinuria provocată. Practic am procedat în felul următor: dimineaţa, la intrarea în tură (orele 6,30-7,00), muncitorii se prezentau la laborator „à jeun", pentru a da — prin golirea completă a vezicii — o probă de urină proaspăt emisă, în care se determina imediat *ascorbinuria spontană* prin titrare cu *2,6*-diclorfenol-indofenol, după Tillmans [1]; după predarea probei, persoanelor cercetate li se recolta prin puncţie venoasă circa 2 ml sînge, în care se determina imediat *ascorbinemia*, cu ajutorul metodei recomandate de Roe şi Kuether [5]. Prin acul de puncţie se administrau, imediat după recoltare, 5 ml dintr-o soluţie 10% de acid ascorbic *pro injectione*, adică în total 500 mg de acid ascorbic (doza de încărcare). În acest moment, muncitorii erau instruiţi ca în următoarele 5 ore orice eliminare de urină să se facă exclusiv la laborator, pentru a se putea calcula cît mai exact cantitatea de acid ascorbic eliminată în acest interval. În marea lor majoritate, muncitorii au reţinut urina şi au emis-o sub forma unei probe unice la sfîrşitul celor 5 ore. În această probă (precum şi în rare cazuri atunci cînd probele erau predate şi în interval) vit. C se determina imediat, prin titrare cu *2,6*- diclorfenol-indofenol, obţinîndu-se *ascorbinuria provocată*.

Primele determinări s-au efectuat la 5 martie 1963. Cu această ocazie s-au înregistrat nivelele cele mai scăzute ale tuturor indicatorilor cercetaţi, nivele aflate sub normele considerate optimale*. Pentru atingerea nivelelor optimale s-a procedat la suplimentarea dietei muncitorilor aflaţi în observaţie cu doze crescînde de acid ascorbic, după cum urmează:

5.III — 19.III	(2 săptămîni),	50 mg/zi;
20.III — 2.IV	(2 săptămîni),	100 mg/zi;
3.IV — 17.IV	(2 săptămîni),	150 mg/zi.

* Literatura de specialitate consideră ca optimale următoarele nivele:
— ascorbinemia peste 0,8 mg %;
— ascorbinuria spontană peste 20,0 mg/litru;
— ascorbinuria provocată prin testul de încărcare: eliminarea a cel puţin 40% din doza de încărcare în primele 5 ore.

Ascorbinemia și ascorbinuria s-au determinat la sfîrșitul fiecărei perioade de două săptămîni, ca mai sus.

Paralel cu determinările efectuate la uzina chimică, s-a cercetat — în mod identic — starea de nutriție ascorbică a unui lot de 30 de muncitori de la o fabrică de confecții, servind ca lot de control.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelele nr. 1 și 2 și în figurile 1 și 2.

În atmosfera tuturor locurilor de muncă deservite de muncitorii selecționați din secția de electroliză s-a putut constata prezența mercurului

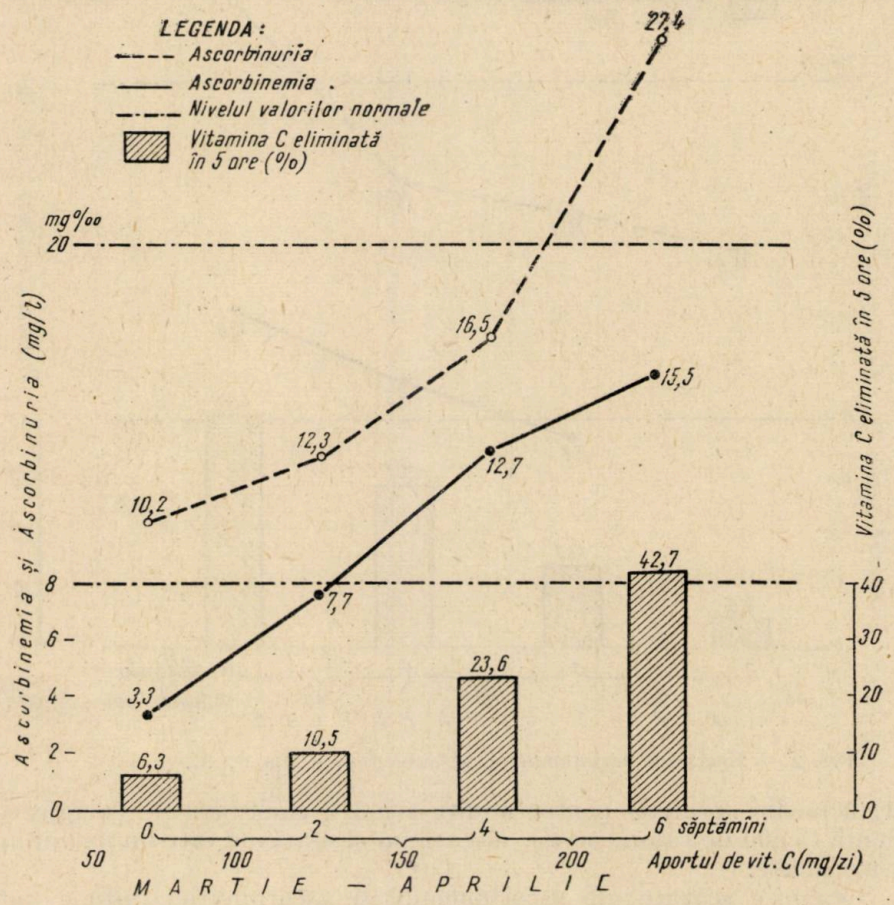


Fig. 1. — Necesarul de vitamină C al muncitorilor din U.C.T.

[6], în unele cazuri depășind de mai multe ori concentrația maximă tolerabilă (0,00001 mg/litru de aer). Cantitatea de mercur eliminată prin urină a variat între 11,0 și 146,0 micrograme la litru, valoarea medie

fiind de 49,0 micrograme la litru, ceea ce poate fi considerat ca efectul unei impregnări moderate a organismului [7].

Aportul alimentar de acid ascorbic, apreciat pe baza anchetei în familie şi la cantină, a variat între 40 şi 60 mg/zi neto (după scăderea pierderilor menajere), fiind în medie de 50 mg/zi. Această cantitate ar fi cu aproximativ 33,0% mai mică decît cea de 75—80 mg/zi, considerată

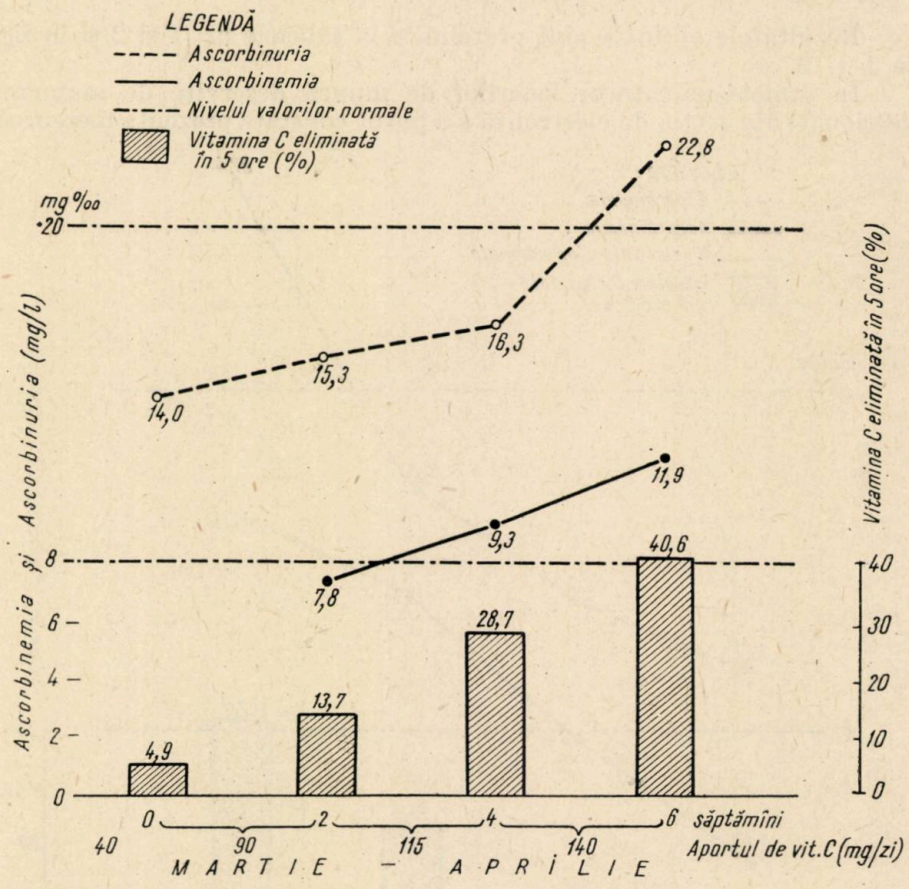


Fig. 2. — Necesarul de vitamină C al muncitorilor din F.C.C.

normă medie optimală pentru adulţi avînd o cheltuială de energie echivalentă (3 500 de calorii pe zi), dar trăind şi muncind într-un mediu lipsit de toxicitate.

Valorile scăzute ale ascorbinemiei şi ascorbinuriei iniţiale pot fi interpretate în parte ca fiind consecinţe ale aportului insuficient de acid ascorbic. După cum rezultă din tabelul nr. 1, valoarea medie a ascorbinemiei a fost de 0,33 mg/100 ml, marea majoritate a observaţiilor (73,5%) nedepăşind limita de 0,40 mg/100 ml, considerată graniţa dintre starea de hipovitaminoză şi starea de uşoară carenţă ascorbică. Ascorbi-

Tabela nr. 1

Ascorbinemia, ascorbinuria spontană şi provocată înainte şi după suplimentarea dietei cu cantităţi crescînde de acid asorbic (50, 100, 150 mg pe zi), administrate timp de cîte două săptămîni la 35 de muncitori de la U.C.T.

INDICATORUL	Înainte de suplimentarea dietei	După 2 săptămîni	După 4 săptămîni	După 6 săptămîni
		de suplimentare cu cantităţi crescînde de acid ascorbic		
Suplimentul de acid ascorbic (mg pe zi)	0	50	100	150
Aportul de acid ascorbic (mg pe zi)	50	100	150	200
I. *ASCORBINEMIA*				
valori medii (mg %):	0,33 ± 0,030	0,77 ± 0,027	1,27 ± 0,058	1,55 ± 0,052
semnificaţia diferenţei dintre medii:		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
distribuţia valorilor individuale (%):				
sub 0,40 mg	73,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
0,40 — 0,79 „	26,5	67,7	0,0	0,0
0,80 — 1,19 „	0,0	29,0	39,4	6,9
1,20 şi peste	0,0	3,2	60,6	93,1
II. *ASCORBINURIA SPONTANĂ*				
valori medii (mg $^{0}/_{00}$)	10,20 ± 0,42	12,30 ± 0,53	16,50 ± 0,80	27,40 ± 1,1
semnificaţia diferenţei dintre medii:		$p < 0,003$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
distribuţia valorilor individuale (%):				
sub 10,0 mg	45,7 %	26,5 %	6,1 %	0,0 %
10,0 — 19,9 „	54,3	73,5	78,8	36,7
20,0 şi peste	0,0	0,0	15,1	63,3
III. *ASCORBINURIA PROVOCATĂ* (cantitatea eliminată în 5 ore de la injectarea (i.v.) a 500 mg acid ascorbic) valori medii (mg):	31,54 ± 2,98 (6,30 %)	52,42 ± 5,61 (10,5 %)	118,25 ± 14,2 (23,6 %)	213,84 ± 15,6 (42,7 %)
semnificaţia diferenţei dintre medii:		$p < 0,003$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
distribuţia valorilor individuale:				
sub 200 mg (sub 40 %)	100,0 %	100,0 %	83,3 %	38,5 %
peste 200 mg	0,0	0,0	16,7	61,5

Tabela nr. 2

Ascorbinemia, ascorbinuria spontană şi provocată înainte şi după suplimentarea dietei cu cantităţi crescinde de acid ascorbic (50, 75, 100 mg pe zi), administrate timp de cîte două săptămîni la 30 de muncitori din F.C.C.

INDICATORUL	Înainte de suplimentarea dietei	După 2 săptămîni	După 4 săptămîni	După 6 săptămîni
		de suplimentare cu cantităţi crescinde de acid ascorbic		
Suplimentul de acid ascorbic (mg pe zi)	0	50	75	100
Aportul de acid ascorbic (mg pe zi)	40	90	115	140
I. *ASCORBINEMIA*				
valori medii (mg %)		0,78±0,063	0,93±0,074	1,19±0,084
semnificaţia diferenţei dintre medii :			$p < 0,05$	$p < 0,05$
distribuţia valorilor individuale (%) :				
sub 0,40 mg		8,7 %	0,0 %	0,0 %
0,40—0,79 ,,		43,5	48,0	38,1
0,80—1,19 ,,		30,4	28,0	38,1
1,20 şi peste		17,4	24,0	23,8
II. *ASCORBINURIA SPONTANĂ*				
valori medii (mg $^0/_{00}$)	14,70±0,84	15,30±0,94	16,30±0,91	22,80±0,46
semnificaţia diferenţei dintre medii :		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,001$
distribuţia valorilor individuale (%) :				
sub 10,0 mg	—	12,5 %	10,0 %	4,0 %
10,0—19,9 ,,	100,0 %	65,0	66,7	40,0
20,0 şi peste	—	12,5	23,3	56,0
III. *ASCORBINURIA PROVOCATĂ* (cantitatea eliminată în 5 ore de la injectarea (i.v.) a 500 mg acid ascorbic) : valori medii (mg) :	24,45±3,76 (4,9 %)	68,51±9,51 (13,7 %)	143,44±17,17 (28,7 %)	203,03±10,58 (40,6 %)
semnificaţia diferenţei dintre medii :		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,01$
distrib. % a valorilor individuale :				
elimină sub 200 mg (sub 40 %)	100,0 %	96,0 %	68,0 %	37,0 %
elimină 200 mg şi peste	0,0	4,0	32,0	63,0

nuria spontană abia a atins concentrația de 10,2 mg/litru, aproximativ jumătate din concentrația considerată ca indicator de saturație (20 mg/litru); cantitatea de acid ascorbic eliminată în primele 5 ore (ascorbinuria provocată) a reprezentat doar 6,3% din doza de încărcare (500 mg de acid ascorbic). Toate aceste valori par să fie disproporționat de mici în raport cu aportul alimentar; de aceea considerăm că nu le putem interpreta ca fiind legate exclusiv de acest aport. Mai degrabă ar trebui să facem legătura cu acțiunea specifică, inhibitoare a mercurului asupra unor sisteme enzimatice, precum și cu selectivitatea de reacție pe care mercurul o are față de grupele tiolice ale componentelor biologice. Pe această bază apare verosimil ca, în urma expunerii la mercur, să se producă — în mod compensator — o solicitare crescută de biocatalizatori, care să suplinească funcția sistemelor inhibate. În consecință s-ar produce o micșorare a rezervelor de biocatalizatori (între care și vit. C) din țesuturi și sînge, o eliminare mai redusă a lor prin urină.

După două săptămîni de suplimentare a dietei cu 50 mg acid ascorbic, prin care aportul mediu de vit. C a crescut de la 50 mg la 100 mg/zi, valoarea medie a ascorbinemiei (0,77 mg%) s-a ridicat pînă aproape de valoarea normală (0,80 mg%), în schimb valorile ascorbinuriei au rămas încă mici (ascorbinuria spontană 12,3 mg/litru, ascorbinuria provocată 10,5 mg%), ceea ce demonstrează o puternică retenție a vitaminei în țesuturi. Această retenție se manifestă și la sfîrșitul perioadei următoare de două săptămîni, cînd, prin suplimentarea dietei cu 100 mg de acid ascorbic, aportul mediu a devenit de 150 mg/zi: ascorbinemia medie (1,27 mg%) se află în zona normală, dar ascorbinuria spontană (16,5 mg/litru), precum și cea provocată (23,6 mg%) nu au depășit pragurile considerate ca indicatori de saturație. Acest fenomen se petrece abia după ridicarea aportului mediu de acid ascorbic la 200 mg/zi, cînd ascorbinemia medie devine 1,55 mg%, ascorbinemia spontană 27,4 mg/litru, iar cantitatea de acid ascorbic eliminată în primele 5 ore după încărcare depășește 40% din doza de încărcare.

Analizînd rezultatele obținute în secția de electroliză, observăm o anumită lipsă de concordanță între răstimpul necesar pentru „normalizarea" ascorbinemiei față de ascorbinurie. Într-adevăr, la sfîrșitul săptămînii a 4-a (aportul mediu de acid ascorbic 150 mg), cînd ascorbinemia medie a devenit 1,27 mg% și toate valorile individuale au depășit nivelul de 0,8% mg, se constată că abia 15—17% dintre persoanele cercetate prezintă o ascorbinurie spontană de peste 20,0 mg/litru și elimină peste 200 mg de acid ascorbic în primele 5 ore după încărcare; nici după un aport zilnic de 200 mg acid ascorbic lotul nu devine în totalitate saturat din punctul de vedere al indicatorilor urinari, ci numai în proporție de 63,3% pentru ascorbinuria spontană, respectiv de 61,5% pentru ascorbinuria provocată. Lipsa de concordanță semnalată mai sus este mult mai atenuată în cazul lotului de control: după un aport mediu de 140 mg vit. C, 61,9% dintre indivizi prezintă o ascorbinemie de peste 0,8 mg %, 56,0% au o ascorbinurie spontană de peste 20,0 mg/litru, 63,0% elimină în primele 5 ore mai mult de 200 mg de acid ascorbic (adică mai mult

de 40% din doza de încărcare), aşa dar aproximativ 56 — 63% dintre indivizi sînt saturaţi la toţi indicatorii utilizaţi.

Diferenţa de comportare a celor două loturi apare mai evident dacă se compară rezultatele obţinute la sfîrşitul săptămînii a 4-a (lot cu mercur) cu cele obţinute la sfîrşitul săptămînii a 6-a (lot de control). În aceste momente cele două loturi beneficiau de cantităţi foarte apropiate de vit. C : 150 mg (lot cu mercur), respectiv 140 mg (lot de control) pe zi.

Iată rezultatele :

	Lotul cu mercur	Lotul de control
aportul cotidian de acid ascorbic (mg)	150	140
ascorbinemia medie (mg%)	1,27	1,19
valori individuale peste 0,8 mg%	100,0%	61,9%
ascorbinuria spontană medie (mg/litru)	16,5	22,8
valori peste 20 mg/litru	15,1%	56,0%
ascorbinuria provocată medie (mg/5 ore)	118,26	203,03
valori peste 200 mg/5 ore	16,7%	63,0%

Din datele de mai sus reiese clar că, în timp ce valorile medii ale indicatorilor sanguini sînt foarte apropiate — fiind în corelaţie directă cu valorile aportului de acid ascorbic — indicatorii urinari (ascorbinuria spontană şi provocată) arată diferenţe indiscutabile, în sensul că mai mult de jumătate dintre indivizii aparţinînd lotului de control apar ca saturaţi, faţă de abia 15—17% din cadrul lotului expus la mercur.

Deoarece metoda de cercetare a fost identică şi s-a aplicat concomitent, deosebirea de comportament a celor două loturi ar putea fi interpretată în sensul unei modificări funcţionale a pragului renal care ar apărea la muncitorii din electroliză ca o consecinţă a creşterii necesarului de acid ascorbic sub influenţa mercurului.

Rezultatele obţinute de noi sînt analoge celor obţinute de Gonţea şi colab. [4], care făcînd cercetări într-o fabrică de acumulatori, au constatat că nevoile de vit. C ale muncitorilor expuşi cronic la plumb sînt mărite : în perioada martie-aprilie optimul de vit. C pare să fie în jur de 200 mg/zi. Autorii interpretează fenomenul ca fiind, probabil, legat de „accentuarea (în prezenţa plumbului) participării acidului ascorbic la procesele de oxidoreducere".

Încercînd să interpretăm în paralel unele mecanisme biochimice de acţiune care caracterizează cele două metale, legate de componentele active cu funcţiuni tiolice, precum şi de cele cu grupări fosforilate (aceste mecanisme interesînd îndeaproape sistemele enzimatice), s-ar părea că există, din acest punct de vedere, o convergenţă înspre o solicitare crescută de biocatalizatori, ca urmare a inhibiţiei produse de cele două toxice în cadrul sistemelor catalitice. Se pare de asemenea, apreciind în mod global aceste mecanisme, că la efecte similare ar putea conduce şi contactul cronic cu alte metale grele, de exemplu cu cadmiu şi crom. Vitamina C fiind un biocatalizator de cea mai mare importanţă pentru organism,

care intervine în mod cert în aceste mecanisme enzimatice, apare explicabil ca solicitarea ei să se manifeste și din punct de vedere cantitativ, nu numai din punct de vedere calitativ. În măsura în care o asemenea interpretare a fenomenelor corespunde realității, ea permite o generalizare a rezultatelor obținute concret la plumb și mercur asupra sferei metalelor grele. Așadar, am putea să avansăm — cu titlu provizoriu — părerea că rația de vit. C pentru muncitorii aflați timp mai îndelungat sub influența metalelor grele este în jur de 200 mg/zi în perioada trebuințelor maxime (februarie—aprilie).

Din analiza mecanismelor biochimice de relație între substanțele toxice amintite și organism se mai ridică și o altă ipoteză. Avînd în vedere că este vorba de tulburări ale funcțiilor tiolice și ale celor de fosforilare, pe care le întîlnim în procesele de respirație celulară și de fosforilări oxidative, schemele acestor reacții ne atrag atenția asupra unor factori complementari, ca, de exemplu vit. B_1, acidul lipoic, coenzima A etc., a căror participare este esențială pentru buna desfășurare a reacțiilor respective. Considerăm că, în vederea unei analize mai complete a problemei privind mecanismele prin care vit. C, precum și alte vitamine, își exercită, rolul lor protector în stări de intoxicații profesionale, ar fi interesant și, totodată, util să se abordeze cercetări în această direcție.

CONCLUZII

1. Trebuințele de acid ascorbic ale unui grup de muncitori care lucrează în mediu cu mercur sînt mărite în comparație cu un grup de muncitori neexpuși.

2. În perioada martie—aprilie aceste trebuințe sînt de aproximativ 200 mg acid ascorbic/zi.

3. Cercetările efectuate ridică ipoteze interesînd îndeaproape mecanismul de acțiune a metalelor grele, în corelație cu sistemul enzimatic și vitaminele, sub rezerva unor cercetări confirmative.

Institutul de igienă și sănătate publică, Cluj,
Secția de igiena alimentației

Prezentată la redacție la 28 iunie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. P. Balint, A. Hegedus, *Klinikai láboratorium diagnosztika.* Budapesta, 1955,
2. V. Comes. V. Galea, Florica Pușcariu, Margareta Weinlich, *Referatele și rezumatele comunicărilor la primul Congres național de igienă și protecția muncii*, București, 175 (1963).
3. V. Galea, V. Comes, St. cerc. med., Acad. R.P.R., Filiala Cluj, **XIV**, *1*, 105 (1963).
4. I. Gonțea, S. Dumitrache, Alice Rujinski, Despina Cocora, Igiena, **XIII**, *2*, 109 (1964).
5. J. H. Roe, C. A. Kuether, J. biol. Chem., *147*, 399 (1943).
6. A. V. Stepanov, *Chimia judiciară*, Edit. de stat pt. lit. științifică, București, 160, (1954).
7. B. Nestorescu, Igiena XI, *6*, 539 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 43–48 (1965)

ACȚIUNEA ACIDULUI DEZOXIRIBONUCLEIC EXTRAS DIN ȚESUTURI NORMALE ȘI IRADIATE ASUPRA ACTIVITĂȚII CATALAZEI HEPATICE *

NOTA I

MARIA FURNICĂ, ELENA POPA și O. POPOVICI

616.155.3–09

Rezumat. — S-a studiat acțiunea ADN extras din ficat de șobolani normali sau iradiați (1000 r) asupra activității catalazei. ADN nativ extras din ficatul normal activează catalaza hepatică cu 35%. ADN extras din ficatul iradiat o activează cu 92%. Preparatul denaturat cu uree reduce cu 20% activitatea catalazei. Preparatul comercial nu influențează activitatea catalazei. Se pare că acțiunea ADN nativ asupra catalazei este legată de prezența macromoleculei nedenaturate. Diferența de acțiune între ADN extras din țesutul normal sau iradiat nu poate fi explicată prin conținutul diferit de Cu^{2+} sau Fe^{2+}

A fost demonstrat de repetate ori faptul că sub acțiunea radiațiilor ionizante se produc tulburări importante ale metabolismului acizilor nucleici, avînd ca urmare o inhibiție a sintezei acestor acizi [1–4].

Mult mai puține și de dată recentă sînt rezultatele care demonstrează modificarea calitativă a acestor compuși în țesuturile iradiate. În general, lucrările de acest gen au studiat acizii nucleici sub aspect fizico-chimic (în soluții pure de acizi nucleici) sau indirect, prin apariția mutanților (în genetică).

Modificarea calitativă a acizilor nucleici sub influența radiațiilor ionizante a fost abordată, din punct de vedere biochimic, sub următoarele aspecte :

a) În zilele care urmează după iradiere, ADN izolat din splina șobolanilor iradiați cu doza de 400 r conține mai puțină timină decît ADN izolat din splina neiradiată [5].

b) Modificarea vitezei de includere a diferitor precursori în molecula de ADN : J. Passonneau ș J. Totter [6] constată că la embrionii de găină iradiați cu 5000 r scade puternic includerea formiatului — C^{14} în timidină în timp ce includerea moleculei de adenină—C^{14} în ADN nu se modifică. Kuzin și colab. [7] au observat că sub acțiunea iradierii se dereglează viteza de includere a bazelor pirimidinice (citozină și uracil) în molecula de ARN.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 2 (1965) în limba franceză.

c) Acţiunea asupra fosforilării oxidative : M. E. Kuzin şi V. E. Budilova [8] constată că ADN extras din ţesuturi normale nu are acţiune asupra fosforilării oxidative a mitocondriilor normale, dar stimulează fosforilarea oxidativă diminuată a mitocondriilor extrase din ţesuturi iradiate. Adaosul de ADN iradiat la mitocondriile extrase din ţesuturi iradiate nu mai influenţează fosforilarea oxidativă.

d) Acţiunea asupra respiraţiei tisulare : O. P. Cepinoga [9] constată că dezoxiribonucleatul de sodiu are efecte antagoniste asupra respiraţiei cupelor de ţesut în funţie de gradul de polimerizare (ADN puternic polimerizat reduce consumul de oxigen al ţesuturilor, ADN de polimerizat — cum este cel iradiat —,acţionează ca activator).

Lucrarea noastră se integrează pe linia cercetărilor care urmăresc punerea în evidenţă a modificărilor calitative al ADN după iradiere prin influnţarea unor procese biochimice. Testul ales pentru urmărirea influenţei ADN normal sau iradiat a fost activarea catalazei hepatice. Ne-am oprit asupra acestui proces deoarece se ştie că H_2O_2 formată în ţesuturile iradiate induce depolimerizarea meleculei de ADN, iar catalaza exercită un efect inhibitor asupra acestei reacţii [10]. Pe de altă parte, cercetările lui Aranson au pus în evidenţă formarea unui complex între ARN şi catalază [11], complex care se descompune sub acţiunea radiaţiilor [12]. De aceea, prima parte a lucrării noastre a trebuit să demonstreze că alegerea utilizării catalazei ca test este adecvată cercetărilor noastre.

Partea a doua a lucrării se ocupă de acţiunea ADN extras din ficatul şobolanilor normali sau iradiaţi asupra activităţii catalazei. Un factor de care a trebuit să ţinem seama a fost acela al intervalului ales pentru sacrificarea animalelor după iradiere. Se ştie că în cazul iradierii cu doze minime letale (1000 r pentru şobolan) cantitatea de acizi nucleici tisulari scade în primele 3—5 zile, după care urmează un proces de restaurare. Se pun următoarele întrebări : 1) dacă modificarea cantităţii este însoţită şi de o modificare calitativă ; 2) dacă această modificare calitativă, apărută în perioada de distrugere tisulară (cam după 3 zile de la iradiere), se menţine şi în perioada în care, în aparenţă, organismul a revenit la starea normală (după 9—10 zile de la iradiere).

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Experienţele au fost efectuate pe şobolani Wistar, normali sau iradiaţi, sacrificaţi după 3 zile de la iradierea cu 1 000 r.

Extracţia ADN din ficat s-a efectuat prin metoda Zamenhof—Griboff-Marullo [13], căreia i-am adus unele modificări. Astfel, pentru a evita acţiunea depolimerazelor extracţia ADN s-a făcut fără întrerupere, aşa încît durata extragerii unui preparat de ADN a fost de 2 zile, în loc de 4 zile cum recomandă metoda. Puritatea preparatelor de ADN nativ s-a controlat dozîndu-se în suspensia obţinută şi ulterior diluată cu NaCl 1 M cantităţile de ADN şi ARN. Dozarea ADN s-a efectuat prin metoda cu difenilamină, iar a ARN prin metoda cu orcină. Diferitele preparate obţinute au fost omogene din punct de vedere cantitativ ; reacţia cu orcină a fost în permanenţă negativă ; cantitatea de ADN în suspensia obţinută a fost în jur de 5 mg/ml. Unele preparate de ADN au fost liofilizate.

Am determinat activitatea catalazei hepatice prin metoda manometrică descrisă anterior [14]. Catalaza s-a determinat în ficat de șobolan normal, în absența sau în prezența ADN extras din ficatul unor animale normale sau iradiate sau după adăugarea unui preparat comercial de ADN (Chemische Fabrik Erich Nickel-Heidelberg).

REZULTATE

1. *Acțiunea ADN extras din ficatul normal asupra activității catalazei.* Din tabela nr. 1 se constată că adaosul de ADN la omogenatul hepatic în care se determină activitatea catalazei produce o activare a enzimei. Gradul de activare a variat în limite destul de largi, între 18 și 57%,

Tabela nr. 1

Acțiunea ADN extras din ficat de șobolan normal asupra activității catalazei hepatice

Preparatul	µl O_2/10 min/1 mg țesut		
	−ADN	+ADN	% activare
6.II	95	149	57
14.II	96	112	18
	86	107	24
2.III	39	59	52
17.III	62	73	18
19.III	41	49	21
20.III	37	58	55
21.III	59	71	20
8.IV	86	122	41
9.IV	75	150	50
Media	67	95	35

media activării fiind de 35%. Am prezentat numai rezultatele obținute cu ADN utilizat imediat după extracție, deoarece am constatat că preparatul, o dată liofilizat, dă alte rezultate decît cel lucrat imediat (uneori preparatul liofilizat nu mai are nic o acțiune asupra catalazei).

2. *Acțiunea ADN comercial asupra activității catalazei* (tabela 2). Ne-am pus problema dacă influența ADN asupra activității catalazei este legată de activitatea biologică a preparatului sau de prezența componentelor chimice din moleculă. Utilizînd ADN comercial, deci un preparat lipsit de activitate biologică, în aceleași concentrații cu preparatul nativ, am constatat că preparatul comercial nu influențează semnificativ activitatea catalazei.

Tabela nr. 2

Acțiunea ADN comercial asupra activității catalazei hepatice

Numărul experienței	µl O_2/10min/mg țesut	
	− ADN	+ ADN
1	71	60
2	66	49
3	48	54
4	88	93
5	52	41
6	48	52
Media	62	58

3. *Acţiunea ADN denaturat asupra activităţii catalazei* (tabela 3). Deoarece activarea catalazei pare să fie legată de prezenţa moleculei nedenaturate de ADN, am verificat acest lucru cu ajutorul preparatului nativ pe care l-am denaturat prin încălzire cu uree. Am constatat că ADN extras din ţesut normal şi denaturat cu uree exercită o uşoară inhibiţie asupra activităţii catalazei hepatice (21%).

Tabela nr. 3

Acţiunea ADN denaturat cu uree asupra activităţii catalazei hepatice

Numărul experienţei	µl O_2/10 min/mg ţesut		
	— ADN	+ ADN	%
1	76	63	21
2	76	62	21
Media	76	62,5	21

4. *Acţiunea ADN extras din ficatul şobolanilor iradiaţi asupra activităţii catalazei* (tabela 4). ADN extras din ficatul iradiat se deosebeşte de preparatul obţinut din ţesutul normal. Aceste diferenţe se observă chiar în timpul extragerii ADN din ţesut. De exemplu am constatat că volumul de soluţie de NaCl 2 M necesar pentru extracţia nucleoproteinelor din ţesutul iradiat poate fi mai mic decît pentru extracţia din ţestul normal. De asemenea, raportînd la greutatea de ţesut hepatic utilizat pentru obţinerea ADN nativ, se constată că preparatul extras din ficat iradiat are o concentraţie mai mică în ADN decît cel obţinut din ficat neiradiat. La baza diferenţelor de concentraţie stă, desigur, inhibiţia biosintezei ADN sub acţiunea radiaţiilor.

Tabela nr. 4

Acţiunea ADN extras din ficat de şobolan iradiat asupra activităţii catalazei hepatice

Preparatul	µl O_2/10 min/mg ţesut		
	— ADN	+ ADN	% activare
1.II	30	63	110
	56	107	90
2.III	39	66	70
5.III	29	64	118
6.III	35	70	50
17.III	62	88	42
19.III	41	75	68
20.III	37	71	90
21.III	39	89	130
Media	40	77	92

În tabelul nr. 4 am prezentat rezultatul acţiunii preparatului de ADN nativ, extras din ficatul iradiat, asupra activităţii catalazei. Se constată

că gradul de activare a catalazei este mult crescut față de adaosul de ADN normal (92%). Acest lucru apare mai evident în cazul urmăririi acțiunii paralele a ADN extras din ficat normal sau iradiat, pe același omogenat hepatic, pentru a evita variațiile individuale ale activității catalazei (tabela 5). În permanență se observă o activare mult mai mare la adaosul de ADN iradiat, față de cel neiradiat.

Tabela nr. 5

Acțiunea ADN extras din ficat normal sau iradiat asupra activității catalazei din același omogenat hepatic

Preparatul		µl O_2/4 min/1 mg țesut			µl O_2/10 min/mg țesut		
		− ADN	+ ADN	% activare	− ADN	+ ADN	%activare
4.II	N	91	150	65	—	—	—
	I	91	189	106	—	—	—
6.II	N	51	107	106	—	—	—
	I	51	148	180	—	—	—
6.II	N	45	61	40	95	149	57
	I	45	144	80	—	—	—
2.III	N	—	—	—	39	59	52
	I	—	—	—	39	66	70
17.III	N	26	34	33	62	73	18
	I	26	41	62	62	88	42
19.III	N	—	—	—	41	49	21
	I	—	—	—	41	75	68
20.III	N	—	—	—	37	58	55
	I	—	—	—	37	71	90
21.III	N	—	—	—	39	71	82
	I	—	—	—	39	89	130

5. *Acțiunea Cu^{2+} și Fe^{3+} asupra activității catalazei hepatice* (tabela nr. 6). Deoarece a reieșit că numai preparatele native, biologic active, influențează activitatea catalazică, am încercat să explicăm diferența de comportare între ADN extras din ficatul normal și cel iradiat. O primă încercare a fost inspirată de lucrări recente [15] [16], care au pus în evidență prezența ionilor de Cu^{2+} și Fe^{3+} în macromolecula de ADN. Considerînd că în molecula iradiată acești ioni pot veni mai ușor în contact cu catalaza, exercitînd efectul activator, am experimentat acțiunea soluției de $CuSO_4$ 0,1% și de $FeCl_3$ 0,1% asupra activității catalazei (0,1 ml probă). Am constatat că ionii Cu^{2+} și Fe^{3+} nu influențează activitatea catalazică, deci prezența lor nu poate explica diferența de comportare între ADN nativ și cel iradiat.

Tabela nr. 6

Acțiunea Cu^{2+} și Fe^{3+} asupra activității catalazei hepatice

Condițiile experienței	µl O_2/10min/mg țesut
Ficat normal	129
Ficat + Cu^{2+}	136
Ficat + Fe^{3+}	136

DISCUȚII

Din rezultatele prezentate reiese că, urmărind acțiunea ADN asupra activității catalazei hepatice *in vitro*, se pot pune în evidență modificări calitative ale acestuia. Mecanismul care stă la baza acestei activări nu

l-am putut explica. S-ar putea ca ADN extras din ţesuturile iradiate să conţină mai puţină timină [5], fapt care să influenţeze activitatea biologică a preparatului.

Faptul că activitatea catalazică este influenţată numai de preparatele native de ADN ne face să ne gîndim la posibilitatea de a utiliza acest test pentru a pune în evidenţă calitatea unui preparat de ADN. Singurul test enzimologic pînă în momentul de faţă în acest scop este utilizarea fosfodiesterazei din *Esch. coli*, care nu acţionează exonucleolitic decît asupra ADN denaturat [17]. Testele utilizate în mod curent pentru a evidenţia denaturarea preparatelor biologice au la bază metode fizico-chimice (absorbţia în U. V.) sau biologice (inducerea transformării bacteriene prin ADN etc.).

În lucrările viitoare vom studia în continuare ADN extras din ţesuturi iradiate în prezenţa substanţelor radioprotectoare, pentru a preciza dacă în acest caz se mai produc modificări calitative.

Institutul oncologic, Bucureşti

Prezentată la redacţie la 10 noiembrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. G. Hevesy, Rev. Modern Phys., **17**, 102 (1945).
2. M. Errera, *Protoplasmatologia*, t. **X** partea a 3-a, Springer Verlag, Viena, 1957.
3. M. G. Ord, L. A. Stocken, Biochem. Biophys. Acta, **29**, 201 (1958).
4. O. Costăchel, M. Furnică, G. Furnica, O. Popovici, St. cerc. biochim. **3**, *1*, 21 (1960).
5. M. Berenbom, E. R. Peters, Rad. Res., **5**, 515 (1956).
6. J. Passoneau, J. Totter, Rad. Res., **3**, 304 (1955).
7. A. M. Kuzin, Sun-Ci, G. M. Saenka, Biofizika, **3**, 325 (1958).
8. A. M. Kuzin, E. V. Budilova, Dokl. Akad. Nauk SSSR, **120**, *2*, 361 (1958).
9. O. I. Cepinoga, Ukrain. Biohim. Jurn., **30**, 585 (1958).
10. K. Bernhein, M. Kofler, Experientia, **XX**, *1*, 16 (1964).
11. D. L. Aranson, M. J. Fraser, C. L. Smith, Rad. Res., **5**, 225 (1956).
12. W. A. Creasey, Bioche.m J., **77**, 5 (1960).
13. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, vol. **3**, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1959.
14. M. Furnică, St. cerc. biochim. **7**, *3*, 351 (1964).
15. W. E. C. Wacker, J. B. L. Valee, J. Biol. Chem., **234**, 3257 (1959).
16. H. Altmann, G. Stehlik, K. Kaindl, Atompraxis, **9**, *7*, 255 (1963).
17. J. Marmur, R. Rownd, C. L. Schildkraut, în *Progress in Nucleic Acids Research*, sub redacţia J. N. Davidson, W. E. Cohn, Academic Press, New York, 1963, vol. **1**, p. 231.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 49–53 (1965)

METODĂ PENTRU EXTRAGEREA GLICOPEPTIDELOR DIN MATERIALE BIOLOGICE (ALBUȘ DE OU, SER UMAN) *

I. KIȚULESCU, V. BĂLUȚĂ și D. PASCU

616.153.96 ; 547.96

Rezumat. — Diversitatea foarte mare și importanța biologică mereu crescîndă a glicopeptidelor impun căutarea unor metode prin care aceste macromolecule să se extragă din diverse materiale biologice nu numai cu un randament cît mai mare, dar și cu o oarecare selectivitate.

Mediatorii chimici ai activității nervoase, asociați activității proteazelor, oferă posibilitatea extragerii din diverse materiale biologice a unor cantități foarte mari (care depășesc extragerile prin metodele obișnuite) de glicopeptide, determinînd și o selecționare a acestora.

Sînt prezentate exemple care privesc extragerea glicopeptidelor din albușul de ou după diverse perioade de incubare a oului și de asemenea extragerea glicopeptidelor din sînge uman recoltat în stări fiziologice normale și patologice.

Diferite lucrări [1], [2] au semnalat în ultimii ani variații mari cantitative ale glicopeptidelor serice, în relație cu cele mai diverse afecțiuni clinice (infecții acute și cronice, cancer, boli cardiovasculare etc.), stimulînd interesul pentru studiile menite să stabilească semnificațiile fiziologice și în special fiziopatologice ale glicopeptidelor apărute în cantități crescute în ser, pentru compoziția chimică a acestora și de asemenea pentru proveniența lor, în scopul lărgirii posibilităților de diagnostic clinic.

Un număr important de citologi, fiziologi celulari, biochimiști și biofizicieni care studiază funcționarea membranelor celulare se centrează în special asupra constituenților mucoproteinici, mucolipidici ai membranelor, pe baza cărora stabilesc anumite caractere electroforetice, mobilitatea electrocinetică și diverse fenomene biochimice care interesează transportul diferențial pasiv sau activ al moleculelor mari sau mici prin diverse membrane celulare.

Este atrasă în special atenția asupra sarcinii electrice „negative" accentuate a celulelor tumorale, acest caracter fiind în relație cu acidul sialic, component al glicopeptidelor [3].

Cercetări farmacologice au folosit glicoproteine ca agenți antivirotici : Cohen și Belyavin [4] au studiat un număr mare de mucoproteine,

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba franceză.

adică sialilamino-oligozaharizi, capabile să neutralizeze anumite tulpini de virusuri gripale, iar studii de acest gen se află în atenția a numeroși cercetători care se ocupă de chimioterapia cancerului.

Toate acestea demonstrează importanța mereu crescîndă a macromoleculelor glicopeptidice și, totodată, necesitatea metodelor care să permită extrageri cît mai eficiente ale acestor componente și diferențierea lor.

Lucrarea de față are scopul de a prezenta o metodă de extragere a glicopeptidelor lucrate pe albuș de ou și sînge uman, prin care s-a obținut nu numai un randament crescut față de metodele de extragere cunoscute, dar și o diferențiere calitativă a glicopeptidelor extrase.

Avînd în vedere importanța cu totul deosebită a glicopeptidelor atît pentru cercetările privind diagnosticul bolii canceroase în afara prezenței tumorii, cît și pentru studiile de imunoterapie și de imunogenetică a relațiilor tumoare-gazdă, cercetarea diferențiată a variației cantitative și calitative a mucoproteinelor poate constitui un tip de model experimental pentru studiul troficității tumorii, și în special, al bioritmicii acesteia.

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul experimental a fost constituit din albuș provenit din ouă fecundate — incubate perioade variate, cuprinse între 1 zi și 8 zile —, ser uman și sînge total uman provenit de la pacienți canceroși și necanceroși.

Metoda are la bază două categorii de fapte :

a) Utilitatea proteazelor în creșterea randamentului extragerii glicopeptidelor, cunoscută și folosită de un număr de autori în procedeele lor de extracție a glicopeptidelor [5], [6], [7] etc. și

b) Rolul mediatorilor activității nervoase în influențarea selectivă a proteazelor, demonstrat de noi în mai multe lucrări [8], [9], [10].

Pentru proteoliza albușului de ou și a serului uman am folosit papaina, în concentrație de 0,2 g% pentru ser și 0,5 g% pentru albușul de ou. Timpul de hidroliză enzimatică a fost de 24 de ore.

Pentru diferențierea glicopeptidelor din sîngele total uman recoltat de la pacienți normali și canceroși am folosit papaina în concentrație de 4,5 mg % și un timp de hidroliză enzimatică de 4 ore.

Papaina a fost adăugată albușului de ou, serului uman și sîngelui total uman după ce acestea au fost aduse la pH 5,5 cu HCl N, iar menținerea pH-ului s-a făcut prin adaosul tamponului acetat în care a fost dizolvată papaina.

Pentru influențarea selectivă a extragerii glicopeptidelor s-au folosit histamina și acetilcolina, după cum urmează :

Acetilcolina s-a folosit asociată cu CoA, deoarece, așa cum am arătat în alte lucrări [8], [9], [10], acțiunea ei este mult crescută în prezența CoA. S-au folosit următoarele concentrații : pentru albușul de ou, 10 mg Ach și 0,1 mg CoA/g albuș, iar pentru serul uman 1 mg Ach și 0,01 mg CoA/ml ser.

Pentru sîngele total uman, histamina în concentrație de 5 mg/ml sînge, acetilcolina 2,5 mg/ml sînge și CoA 0,025 mg/ml sînge.

Mediatorii activității nervoase, acetilcolina și histamina, s-au adăugat materialelor biologice în concentrațiile menționate, o dată cu proteaza. După oprirea hidrolizei enzimatice s-au extras glicopeptidele și s-a dozat cantitatea lor.

La albușul de ou și la serul uman hidroliza enzimatică a fost oprită prin precipitarea proteinelor cu etanol 96°, după care precipitatul a fost dizolvat în acid acetic 0,1 N și trecut prin coloană de Sephadex pentru purificarea glicopeptidelor, după procedeul folosit de Porath și colab. [4].

La sîngele uman, hidroliza enzimatică a fost oprită cu acid percloric. Glicopeptidele solubile în acid percloric au fost precipitate cu acid fosfotungstic, după tehnica dată de Winzler [12].

Dozarea hexozelor din glicopeptide s-a făcut după tehnica dată de Winzler [12], iar azotul proteic din acestea după metoda Lowry [13].

REZULTATE

Rezultatele sînt înscrise în figurile și tabela incluse în lucrare.

Figura 1 ilustrează evident randamentul mult crescut al extragerii glicopeptidelor din albuș de ou prin acetilcolină + papainã, comparativ cu extragerea în care s-a utilizat numai papaina. Adăugarea acetilcolinei a provocat o creștere cu peste 100% a cantității glicopeptidelor extrase prin acțiunea proteazei.

Figura 2 deomnstrează de asemenea cantitatea mult crescută a glicopeptidelor extrase prin acetilcolină-papainã, față de extragerea în care s-a utilizat numai papainã. Materialul biologic din care s-a făcut extragerea este de data aceasta serul uman. Și în cazul acestui material acțiunea acetilcolinei determină o sporire cu peste 100% a randamentului extragerii.

Fiura 3 demonstrează diferențierea calitativă pe care o determină histamina și acetilcolina între glicopeptidele din sîngele canceros și cele din sîngele necanceros.

Această diferențiere se exprimă prin capacitatea mult scăzută a mediatorilor (histamina + acetilcolina) de a spori cantitatea glicopeptidelor extrase prin acțiunea proteazei, constatată la sîngele provenit de la bolnavi canceroși, comparativ cu acțiunea mediatorilor asupra extragerii glicopeptidelor din sîngele necanceros.

Diferențierea calitativă determinată de mediatori în extragerea glicopeptidelor este demonstrată și de rezultatele înscrise în tabela nr. 1.

Tabela nr. 1

Variația cantității și a compoziției glicopeptidelor eliberate din albușul oului de găină, după diferite perioade de incubare a oului (în mg)

Perioada de incubare	Cantitatea de glicopept. (% g albuș umed)	Cantitatea de proteină din glicopept. conținută % g albuș umed (N proteic)	Cantitatea de hexoze (galact.—manoză din glicopept), conținută în % g albuș umed	Raportul hexoze/proteină din glicopept. conținute în % g albuș umed
ou martor	300	54,6	21,3	0,39
incubat 48 de ore	733	113,6	52,7	0,46
incubat 5 zile	1 900	323	178	0,55
incubat 8 zile	2 650	530	333,9	0,62

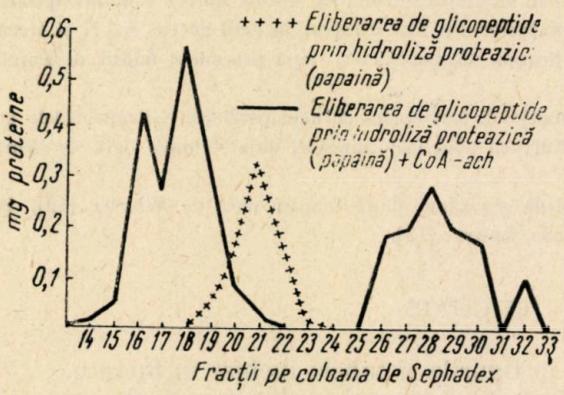
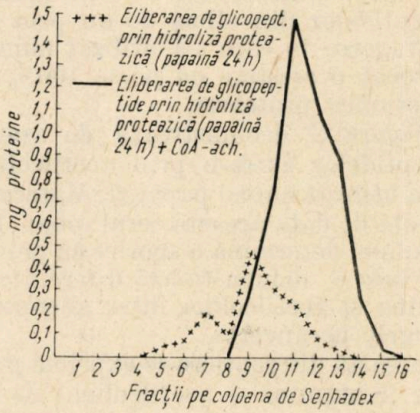


Fig. 1. — Efectul acetilcolinei — CoA asupra eliberării de glicopeptide din albuș de ou.

Fig. 2. — Efectul acetilcolinei — CoA asupra eliberării de glicopeptide din ser uman.



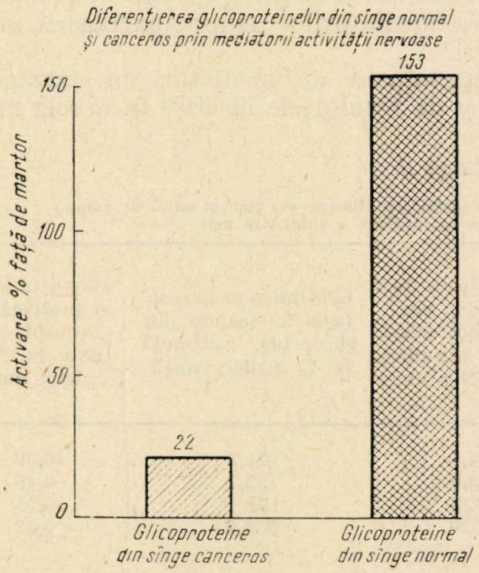


Fig. 3. — Acțiunea diferențiatoare a acetilcolinei și histaminei asupra extragerii glicopeptidelor din sîngele canceros și necanceros.

Acestea ilustrează cantitatea și componența glicopeptidelor extrase din albușul de ou după diferite perioade de incubare a acestuia.

Interesant este faptul că raportul dintre hexozele și proteina conținute în glicopeptidele extrase din albușul de ou prin acțiunea mediatorilor adăugați proteazei prezintă o creștere permanentă, în relație cu înaintarea procesului de embriogeneză. Astfel, la oul neincubat acest raport este de 0,39, după o incubare de 48 de ore valoarea raportului crește la 0,46, după o incubare de 5 zile la 0,55, iar în glicopeptidele extrase din albușul oului incubat 8 zile raportul dintre hexoze și proteină este de 0,62.

Institutul oncologic, București

Prezentată la redacție la 28 octombrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Greenspan E. M., Arch. Intern. Med., **93**, 863 (1954).
2. Bötinger L. E., Carlson, L. A., Clin. Chim. Acta, **664**, 5 (1960).
3. Cook G. M. W., Heard D. H., Seaman G. V. F., Nature, **195**, 159 (1962).
4. Cohen A., Belyavin G., Virology, **7**, 59 (1959).
5. Marks G. S., Marshall R. J., Neuberger A., Papkoff H., Biochem. Biophys. Acta, **63**, 340 (1962).
6. Kamiyama S., Schmid K., Biochem. Biophys. Acta, **58**, 8 (1962).
7. Fletcher A. P., Marks G. S., Marshall R. D., Neuberger A., Biochem. J., **87**, *2*, 265 (1963).
8. Kițulescu I., Băluță V., St. cerc. biochim., **5**, 227 (1962).
9. Costăchel O., Kițulescu I., Voiculeț N., Acta biologica et medica germanica, *5*, 187 (1960).
10. Kițulescu I., Băluță V., St. cerc. biochim., **6**, 523 (1963).
11. Porath J., Flodin P., Nature, **183**, *4676*, 1657 (1959).
12. Winzler R. I. in *Methods of biochem. analysis*, Ed. Glick, D., **III**, 279 (1955).
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. G., J. biol. Chem., **193**, 265 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 55–58 (1965)

MUCOPROTEINELE SERICE CA MIJLOC DE DIFERENȚIERE A PROTEAZELOR DIN SERUL ANIMALELOR PURTĂTOARE ȘI AL CELOR NEPURTĂTOARE DE TUMORI *

I. KIȚULESCU, V. BĂLUȚĂ și D. PASCU

616.006.092.9 : 616.153.1

Rezumat. — S-a studiat capacitatea a 4 mucoproteine diverse, extrase din serul șobolanilor necanceroși, de a influența activitatea triptică din serul șobolanilor canceroși și necanceroși.

Mucoproteinele extrase din serul animalelor cărora li s-au grefat fragmente tisulare (creier, splină, heterografă) puțin timp înainte de extragere se diferențiază net de mucoproteinele extrase din serul animalelor care n-au suferit nici o grefă. Acestea din urmă influențează puternic activitatea triptică a serului, determinînd o sporire cu peste 100% a acestei activități. Mucoproteinele extrase din serurile animalelor grefate nu influențează decît foarte slab sau de loc activitatea protează a serului.

Se constată diferențieri în privința răspunsului proteazelor din serul animalelor purtătoare sau nepurtătoare de tumori la acțiunea mucoproteinelor.

Proteazele din serul animalelor purtătoare de tumori, în prezența mucoproteinelor extrase din serul animalelor care n-au suferit agresiuni (grefe), sînt activate mai puternic (aproximativ de două ori mai mult) decît proteazele din serul animalelor necanceroase.

Variațiile mucoproteinelor serice constatate în diverse stări patologice [1] și ca răspuns imediat la diverse agresiuni [2] au ridicat problema biosintezei acestor mucoproteine și a diferențierii lor calitative.

Într-o lucrare anterioară [3] am arătat că grefe tisulare diverse (grefa de creier, splină, tumoare izologă și heterologă) determină fiecare răspunsuri diferențiate în privința variațiilor mucoproteinelor serice. Diferențierile semnalate s-au bazat, pe de o parte, pe ritmurile variațiilor cantitative produse de fiecare grefă în parte, care sugerau posibilitatea unor biosinteze diferite, și pe de alta pe variațiile constitutive ale mucoproteinelor apărute în ser prin acțiunea stimulatoare a acestor agresiuni diferite. Variațiile constitutive au fost exprimate prin raportul dintre carbohidrat (hexoze) și proteina conținută de mucoproteinele serice în diversele etape ale apariției lor în ser.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 2 (1965), în limba engleză.

Pentru a aduce noi clarificări în privința diferențierii calitative a mucoproteinelor serice, am încercat în lucrarea de față să stabilim raportul care există între diversele mucoproteine serice și proteazele serice. Pentru aceasta, am extras din ser mucoproteinele care apar ca răspuns imediat față de agresiuni specifice (grefa de creier, grefa de splină, grefa unei tumori heterologe), pentru a le compara cu mucoproteinele extrase din serul animalelor care nu au suferit nici o agresiune (animale normale).

Am studiat influența pe care aceste mucoproteine o determină asupra activității triptice din serul animalelor purtătoare și nepurtătoare de tumori.

MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru extragerea mucoproteinelor serice au fost pregătite 4 loturi de șobolani. Dintre acestea, 3 loturi au fost constituite din șobolani care au fost supuși la agresiuni diverse și sacrificați la perioade stabilite dinainte ca fiind corespunzătoare creșterilor celor mai mari ale mucoproteinelor serice. Lotul al 4-lea (martor) a fost constituit din șobolani normali, care n-au suferit nici o agresiune. Fiecare lot a conținut 40 de animale. Extragerea mucoproteinelor serice s-a făcut după procedeul Weimer și colab. [4], extrăgîndu-se seromucoidul, cunoscut în special prin lucrările lui Winzler. Procedeul a fost aplicat diverselor loturi experimentale după cum urmează:

Lotul I: extragerea mucoproteinelor serice s-a făcut la 48 de ore după ce fiecare animal a fost grefat cu un fragment de aproximativ 200 mg splină.

Lotul II: extragerea mucoproteinelor serice s-a făcut la 72 de ore după ce fiecare animal a fost grefat cu un fragment de aproximativ 200 mg creier.

Lotul III: extragerea mucoproteinelor serice s-a făcut la 24 de ore după ce animalele au fost grefate cu o heterografă tumorală (fragmente de aproximativ 200 mg tumoare H 10 hamster).

Lotul IV: extragerea mucoproteinelor s-a făcut de la șobolani care n-au suferit nici o agresiune.

Mucoproteinele extrase au fost liofilizate și păstrate la temperatura de 5°C.

S-a studiat acțiunea mucoproteinelor asupra activității triptice a serului de șobolan, folosindu-se pentru dozarea tripsinei metoda Anson [5]. Conținutul în mucoproteine al probelor experimentale a fost următorul: 1 mg mucoproteină pentru 1 ml ser diluat (diluția serului: 1 ml ser + 4 ml ser fiziologic).

Activitatea triptică a serului a fost măsurată prin acțiunea de hidroliză a acestuia asupra unui substrat de hemoglobină (2 ml substrat pentru 1 ml ser diluat). Volumul final al fiecărei probe a fost de 3,2 ml. Activitatea enzimatică a fost oprită, după 20 de ore de incubare la 37°C, cu acid tricloracetic (2 ml pentru fiecare probă). Măsura activității a rezultat din cantitatea (mg%) de N tirozinic liberat de către hidroliza enzimatică în perioada de incubare.

S-au folosit în cercetare 10 seruri provenite de la șobolani purtători de tumoare Jensen și 10 seruri provenite de la șobolani necanceroși.

S-au lucrat în paralel probe de verificare a unei eventuale activități enzimatice a mucoproteinelor și de asemenea s-a verificat acțiunea mucoproteinelor asupra proteazelor serice, ținîndu-se mucoproteinele, pentru perioade de timp variabile, în contact cu serul și măsurîndu-se după aceea activitatea enzimatică a serului asupra substratului de hemoglobină.

Aceste probe au demonstrat că nici una dintre mucoproteinele studiate nu are activitate proteazică și că acțiunea lor se datorește contactului cu componentele serului.

REZULTATE

Rezultatele sînt redate în tabelă. Fiecare cifră reprezintă media la 10 determinări. Se constată diferențierea netă a mucoproteinelor extrase din serul animalelor care au suferit diverse agresiuni față de mucoproteinele extrase din serul animalelor normale. Acestea din urmă produc o activare importantă a proteazelor din serul șobolanilor normali și canceroși, sporind activitatea proteazelor din serul normal în medie cu 100%

Tabelă

Influența mucoproteinelor asupra proteazelor din serul animalelor canceroase și necanceroase

Felul mucoproteinei	Activitatea proteazelor din serul *animalelor canceroase*		Activitatea proteazelor din serul *animalelor necanceroase*	
	mg N tirozinic /100 ml ser	% de influențare activare (+) sau inhibare (−)	mg N tirozinic /100 ml ser	% influențare activare (+) inhibare (−)
Fără mucoproteine	7,2	−	9,8	−
Mucoproteine extrase după grefe de splină	6,7	−7	7,9	−24
Mucoproteine extrase după grefă de creier	6,7	−7	10,9	+11
Mucoproteine extrase după heterografă tumorală	6,0	−16	10,1	+3
Mucoproteine extrase de la șobolani normali	24,7	+230	21,3	+111

și activitatea proteazelor din serul canceros în medie cu 230%. Calculul statistic a demonstrat că aceste creșteri sînt semnificative. Mucoproteinele extrase din serul animalelor care au suferit diverse agresiuni influențează foarte slab activitatea proteazelor din serul șobolanilor normali sau canceroși, astfel încît creșterile sau scăderile în activitate determinate de mucoproteine nu depășesc într-un sens sau altul cu 25% activitatea proteazică a serului neinfluențat de mucoproteine.

Calculul statistic a demonstrat că variațiile obținute în activitatea proteazică prin adaosul acestor mucoproteine nu sînt semnificative.

Influențarea activității proteazelor prin mucoproteinele extrase din serul animalelor normale, care nu au suferit agresiuni, scoate în evidență diferențierea dintre proteazele din serul normal și cele din serul animalelor canceroase, deoarece aceeași mucoproteină care provoacă o

activare medie de 115% a proteazelor din serul animalelor necanceroase provoacă o activare cu mult mai mare (+230%) a proteazelor din serul animalelor canceroase.

Institutul oncologic,
Bucureşti

Prezentată la redacţie
la 10 noiembrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. GREENSPAN E. M., Arch. intern. Med., **93**, 863 (1954).
2. CHANDLER A. M., NEUHANS O. W., Am. J. Physiol., vol. **206**, *1*, 169 (1964).
3. COSTĂCHEL O., KIŢULESCU I., PASCU D., Rev. oncol. şi radiol. (sub tipar).
4. WEIMER H. E., WINZLER R. J., J. biol. Chem., **185**, *2*, 561 (1950).
5. ANSON M. J., J. gen. Physiol., **22**, 79 (1938).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 59 – 66 (1965)

MODIFICAREA PROPRIETĂȚILOR ANTIGENICE ALE PROTEINELOR DIN SERUL SANGUIN UMAN ÎN URMA DENATURĂRII TERMICE II. CERCETĂRI ASUPRA FENOMENULUI DE "OMOGENIZARE ELECTROFORETICĂ" *

DAN MOȚET

612.124 : 576.8.097

Rezumat. — Fracțiunea proteică ce apare în cadrul fenomenului de „omogenizare electroforetică" în urma termodenaturării albuminelor și gama-globulinelor (fracțiunea D) este distinctă de alfa- și beta-globuline, cărora li se suprapune doar ca mobilitate electroforetică. Între aceste fracțiuni nu există înrudiri antigenice. De asemenea, ele diferă și prin comportarea la coacervare.

Aceste fapte pledează împotriva ipotezelor că fenomenul de „omogenizare electroforetică" ar putea fi pus în legătură cu posibilitatea unor transformări ale albuminelor în alfa-globuline și ale gamma-globulinelor în beta-globuline.

Fracțiunea D nu mai prezintă înrudiri antigenice nici cu albuminele, nici cu gamma-globulinele din care provine.

În cadrul lucrării s-au adus de asemenea unele modificări în testul dublei difuzii după Ouchterlony și în imunoelectroforeza preparativă în gel de agaroză.

În domeniul denaturării proteinelor din serul sanguin, o problemă controversată este posibilitatea transformării albuminelor în globuline, prin menținerea lor un anumit timp la o temperatură ridicată sau prin acțiunea unor agenți chimici denaturanți.

Primul care a susținut această posibilitate a fost F. Moll [1]. El a constatat că, după termodenaturare, albuminele se comportă similar globulinelor la precipitarea cu sulfat de amoniu.

Problema a fost reluată mai recent și de către alți autori. Troițki și colab. [2], [3] se ocupă de fenomenul de „omogenizare electroforetică" ce constă în aceea că, în urma termodenaturării, serul sanguin prezintă o imagine electroforetică diferită de aceea a serului normal [4], [5]: albuminele și gamma-globulinele scad, iar în zona alfa- și beta-globulinelor apare o nouă fracțiune, omogenă ca aspect. Autorii citați sînt de părere că acest fenomen poate fi pus în legătură cu posibilitatea transformării albuminelor în alfa-globuline și a gamma-globulinelor în beta-globuline, fără ca în cursul acestor transformări ele să sufere o disociere profundă. F. Haurowitz [16] consideră însă că o astfel de transformare este imposibilă, deoarece compoziția în aminoacizi a albuminelor se deosebește de a globulinelor. Autorii citați [2] resping acest argument, pe considerentul

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba engleză.

că „în compoziția alfa- și beta-globulinelor intră cele mai diferite proteine". Desigur că aceasta este o referire la faptul că în zonele alfa și beta se află mai multe fracțiuni proteice, dintre care unele ar putea să nu prezinte o compoziție diferită în aminoacizi față de albumine.

Metodele imunochimice pe care le-am utilizat în lucrarea de față sînt mai potrivite pentru a arăta dacă există vreo înrudire între fracțiunea denaturată din fenomenul de omogenizare electroforetică, pe care o vom denumi fracțiunea D, și fracțiunile globulinice din zonele alfa și beta.

Metodele imunochimice au fost completate cu testul comportării la coacervare, întrucît într-o lucrare anterioară [9] am constatat că această comportare este foarte sensibilă la denaturare. Coacervabilitatea diferitelor fracțiuni din serul sanguin uman diferă cantitativ nu numai în funcție de natura, ci și de gradul lor de denaturare.

MATERIALE ȘI METODE

Coacervarea proteinelor din serul sanguin uman denaturat am realizat-o adăugînd părți egale de ser, soluție de acacia 10% și acid acetic 10%. În acest fel, la un pH între 3,5 și 3,6 se obține cantitatea maximă de coacervat [7]. Fiecare fracțiune proteică coacervează însă în alte proporții, în funcție de natura, precum și de starea ei, nativă sau denaturată [8], [9]. După 15 min, coacervatul este centrifugat, iar supernatantul este analizat electroforetic.

Concentrarea soluțiilor proteice am făcut-o prin dializă față de o soluție 30—50% de acacia în soluție izotonică de clorură de sodiu [7]. Volumul soluției de acacia trebuie să fie de aproximativ 10 ori mai mare decît al soluției proteice de concentrat. Pe această cale am realizat concentrarea supernatantului rămas de la centrifugarea coacervatului, în vederea efectuării electroforezei pe hîrtie.

Electroforeza pe hîrtie. Am folosit hîrtie Whatman nr. 1, un tampon Michaelis cu pH 8,2 și putere ionică 0,065. Tensiunea a fost de 10 V/cm, intensitatea 0,5 mA și timpul de migrare 8 ore. Colorarea benzilor a fost făcută cu albastru de bromfenol, după tehnica lui Durrum [10].

Denaturarea substanțelor proteice am efectuat-o prin menținerea lor în ultratermostatul Höppler timp de 30 min, calculate din momentul în care soluțiile proteice luau temperatura termostatului.

Agaroza. Atît imunoelectroforeza cît și dubla difuzie în gel au fost efectuate în gel de agaroză. Avantajul acestui gel este că se obțin linii de precipitare mai nete și o separare electroforetică mult mai bună decît în agar [11], [12]. Agaroza, împreună cu agaropectina, reprezintă componenții agarului [13]. Ea datorează calitățile sale superioare pentru electroforeză și imunodifuzie faptului că încărcarea sa electrică este foarte slabă, ceea ce face ca adsorbția proteinelor pe acest gel să fie mult mai redusă. Drept urmare, la electroforeză atît curentul de convecție cît și trena fracțiunilor proteice sînt de asemenea mult mai slabe, ceea ce duce la o creștere a calității separărilor în ceea ce privește numărul fracțiunilor și delimitarea acestora. Prepararea agarozei am făcut-o după S. Hjertén [11]. Este de menționat că, ulterior, metoda de preparare a fost simplificată [14], [15] și a intrat chiar în producția industrială (I.B.F.).

Antiserul a fost preparat prin hiperimunizarea iepurilor de aproximativ 2,5 kg cu ser sanguin uman, folosind o schemă de imunizare asemănătoare celei a lui Grabar [16], cu deosebirea că în loc de adjuvantul Freund am utilizat gelul de hidroxid de aluminiu. În prima săptămînă am injectat subcutanat un amestec de 0,5 ml ser uman cu 1,5 ml soluție de clo-

rură de sodiu fiziologică și 2 ml gel ca adjuvant ; în a doua săptămînă am făcut o injecție cu 1 ml ser sanguin, în amestec cu 1 ml soluție salină fiziologică și 2 ml adjuvant ; în a treia săptămînă am injectat 2 ml ser cu 2 ml adjuvant. În săptămînile 4, 5 și 6 am injectat, tot subcutanat, dar de patru ori pe săptămînă ser diluat (o parte ser la opt părți soluție fiziologică de clorură de sodiu) fără adjuvant, în următoarele cantități : săptămîna a 4-a cîte 0,5 ml, săptămîna a 5-a cîte 1 ml și săptămîna a 6-a cîte 2 ml. Sîngerarea s-a făcut la 10 zile după ultima injecție.

Fracțiunile proteice denaturate și nedenaturate au fost obținute prin metoda de electroforeză preparativă în gel de agaroză, elaborată în colaborare cu V. Gheție [17]. Metoda utilizează cuve uzuale de electroforeză în gel și nu necesită nici schimbarea tamponului în cursul analizei, nici folosirea unor sisteme de răcire, putîndu-se lucra la temperatura camerei.

Gelul, cu o concentrație în agaroză de 1,5%, a fost aplicat într-un strat de 1 cm grosime. Întrucît nu erau necesare separări avansate în zonele alfa și beta, nu am utilizat tamponul tris-EDTA-borat, ca în lucrarea citată, ci un tampon veronal-veronal sodic de pH 8,6 și putere ionică 0,050 în cuvă și 0,017 în plăci. Gelul a fost acoperit cu o foiță de polietilenă, așezată în așa fel încît să adere la gel fără a rămîne sub ea bule de aer. Peste această foiță s-a așezat o placă de sticlă. Contactul cu tamponul din cuvă s-a asigurat prin benzi de hîrtie de filtru groasă. S-a utilizat o diferență de potențial de 9 V/cm și o intensitate de 1,9 mA/cm. Timpul de migrare a fost de 20 de ore.

Zonele ce cuprindeau fracțiunile dorite au fost secționate și supuse extracției directe a proteinelor cu soluție fiziologică de clorură de sodiu.

Amănunte suplimentare asupra metodei de electroforeză preparativă pot fi găsite în lucrarea citată.

Am utilizat de asemenea și o metodă simplificată, pe care o recomandăm ori de cîte ori se urmărește separarea unor fracțiuni proteice în vederea analizei prin metoda dublei difuzii după Ouchterlony. În acest scop am supus întîi amestecul proteic (ser sau ser denaturat) unei electroforeze în gel de agaroză [12], după micrometoda lui Scheidegger [18]. Concentrația gelului a fost de 1,3%, tamponul veronal-veronal sodic de pH 8,6 și puterea ionică 0,050 în cuvă și 0,017 în plăci. Tensiunea utilizată a fost de 10 V/cm, iar intensitatea curentului de 0,8 mA/cm. Timpul de migrare 3 ore și 30 min. Din zona fracțiunilor ce urmau să fie analizate prin metoda dublei difuzii am secționat rondelele, pe care le-am introdus apoi în orificiile făcute anterior cu același perforator în gelul de pe placa pregătită pentru efectuarea analizei prin dubla difuzie. În felul acesta am eliminat necesitatea extracției substanțelor proteice din gelul de agaroză, urmată apoi de concentrarea necesară pentru obținerea unor bune rezultate. Totodată, am simplificat și electroforeza preparativă, reducînd mult consumul de timp și material.

Dubla difuzie a fost efectuată după Ouchterlony [19], dar în gel de agaroză. De asemenea, în locul soluției fiziologice de clorură de sodiu am folosit ca mediu de solvire o soluție de clorură de sodiu 8%, cum s-a utilizat în cazul imunoelectroforezei cu antiser de găină [20]. Analize paralele au arătat că, fără a se obține vreo modificare în numărul liniilor de precipitare, calitatea acestora este mult superioară, în sensul că liniile foarte slabe în gelul preparat cu soluție de clorură de sodiu 0,85% apar bine conturate în cazul întrebuințării soluției mai concentrate, de 8%. Spălările au fost făcute tot cu soluție 8%.

Imunoelectroforeza am efectuat-o după tehnica lui Scheidegger [18], dar în gel de agaroză [12], în concentrație de 1,3%. Am utilizat tamponul

veronal-veronal sodic cu pH 8,6 și putere ionică de 0,050 în cuvă și 0,017 în plăci. Tensiunea aplicată a fost de 10 V/cm, iar intensitatea de 0,8 mA/cm. Timpul de migrare, 4 ore. După introducerea antiserului, plăcile au fost ținute timp de 48 de ore în camera umedă, apoi au fost spălate timp de 72 de ore, cu schimbarea soluției de spălare de două ori pe zi. Colorarea plăcilor a fost făcută cu amidoschwarz 10 B.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

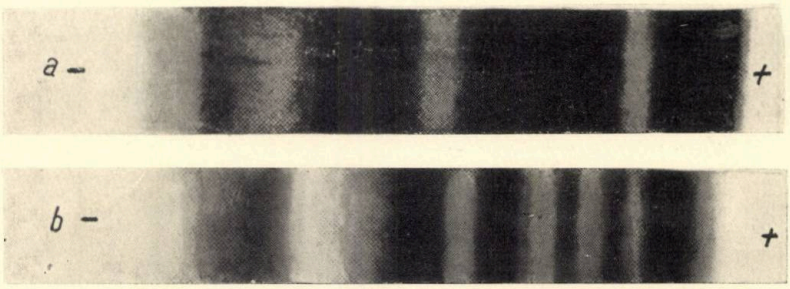
Utilizînd coacervatul „ser sanguin uman-acacia", descris de E.Macovschi și M. Cârsteanu [21] și de E. Macovschi, I. Steopoe și S. Ceaușescu [22], am constatat într-o lucrare anterioară [9] o comportare diferită a fracțiunii D față de fracțiunile alfa și beta. Acest fapt a justificat reluarea experiențelor în lucrarea de față.

În figura 1 se prezintă electroforegrama serului denaturat timp de 30 min la 60°C (*a*) și electroforegrama aceluiași ser după îndepărtarea prin centrifugare a fracțiunilor proteice coacervabile cu acacia (*b*). În prima electroforegramă se poate observa fenomenul de „omogenizare electroforetică", cu apariția fracțiunii denaturate pe care, pentru simplificare, am denumit-o fracțiunea D. Examinînd cea de-a doua electroforegramă, putem vedea că această fracțiune a dispărut, fiind în întregime coacervabilă, iar în locul ei au reapărut fracțiunile alfa- și beta-globulinice, care fuseseră acoperite de ea. Prin comportarea lor diferită la coacervare, aceste fracțiuni arată neidentitatea lor.

Imunoelectroforeza ne-a furnizat de asemenea date interesante. Încă într-o lucrare anterioară [23] am adus unele dovezi indirecte în sprijinul părerii că o tendință de transformare a albuminelor și gamma-globulinelor în alfa- și beta-globuline este puțin probabilă. Dacă această tendință ar exista, ar fi fost logic ca fracțiunile care suferă transformări prin denaturare (albuminele și gamma-globulinele) să prezinte o labilitate mai mare, iar fracțiunile în care acestea s-ar transforma sau ar tinde să se transforme (alfa-, respectiv beta-globulinele) să fie mai stabile. Lucrurile nu se petrec însă așa. În lucrarea citată am arătat că denaturarea unor fracțiuni antigenice din zonele alfa și beta începe chiar la 56°C înainte deci de apariția „omogenizării electroforetice".

S-ar putea obiecta că în zonele alfa și beta se găsesc mai multe fracțiuni, că unele din ele ar putea fi, eventual, mai stabile decît albuminele sau gamma-globulinele și ar putea reprezenta deci produșii lor de transformare. Din aceste motive, în lucrarea de față am mai efectuat unele cercetări imunoelectroforetice și prin metoda dublei difuzii, care să verifice în ce măsură fracțiunea denaturată diferă de albuminele și gamma-globulinele din care provine și dacă nu cumva ea capătă unele înrudiri cu vreo subfracțiune din zonele alfa- și beta-globulinice, după cum presupun autorii citați înainte.

Imunoelectroforezele efectuate cu ser sanguin uman denaturat timp de 30 min la 60°C și ser imun de iepure preparat cu ser uman normal ca antigen (fig. 2) nu arată vreo tendință de apropiere între caracteristicile



F.g. 1. — *Coacervabilitatea fracțiunii D.*

a) Electroforegrama serului sanguin uman denaturat 30 min la 60°C. b) Electroforegrama supernatantului rămas de la centrifugarea coacervatului serului denaturat cu acacia.

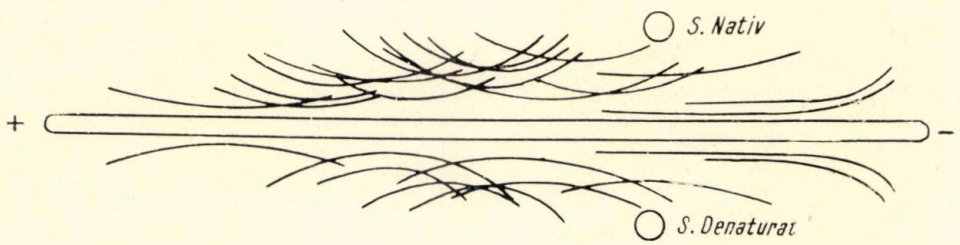


Fig. 2. — *Imunoelectroforeza serului sanguin uman denaturat 30 min la 60°C cu ser imun de iepure antiproteine serice umane nedenaturate.*

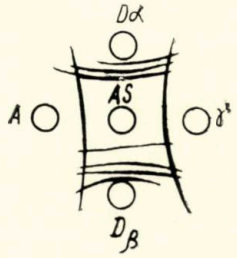


Fig. 3

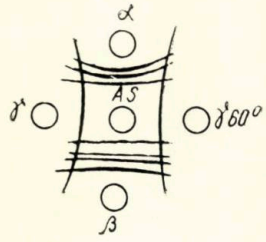


Fig. 4

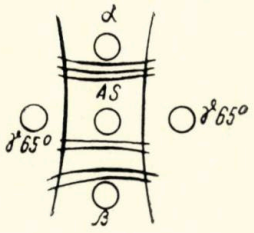


Fig. 5

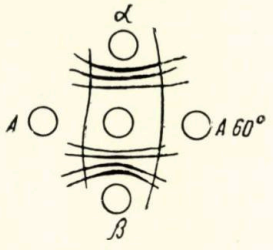


Fig. 6

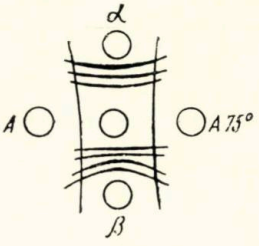


Fig. 7

F g. 3—7. — *Testul dublei difuzii* (*Ouchterlony*). AS = antiser de iepure anti-proteine serice umane nedenaturate.

A = albumine

$A_{60°}$ = albumina denaturată 30 min la 60°C.

$A_{75°}$ = albumina denaturată 30 min la 75°C

γ = γ-globuline

$γ_{60°}$ = γ-globulina denaturată 30 min la 60°C

$γ_{65°}$ = γ-globulina denaturată 30 min, la 65°C.

α = α -globuline

β = β-globuline

$D_α$ = fracțiunea D izolată din zona în care ea se suprapune α-globulinelor

$D_β$ = fracțiunea D izolată din zona în care ea se suprapune β-globulinelor

antigenice ale fracțiunii D și cele ale fracțiunilor alfa și beta cărora ea li se suprapune electroforetic. Astfel, nu se constată o intensificare sau vreo altă modificare a liniilor de precipitare din zonele alfa sau beta cum s-ar întîmpla în cazul cînd fracțiunea D ar căpăta o înrudire antigenică cu fracțiunile normale corespunzătoare acestor zone. De asemenea, nici liniile de precipitare corespunzătoare albuminelor, respectiv gamma-globulinelor, nu se prelungesc către zona în care se situează fracțiunea D mai mult decît în cazul imunoelectroforegramei serului normal. Aceasta ar arăta că în condițiile noastre de denaturare fracțiunea nou apărută nu mai păstrează din caracterele antigenice ale fracțiunilor albuminice și gamma-globulinice din care provine. În consecință, nu considerăm valabile argumentele imunoelectroforetice aduse de unii autori [3] în sprijinul posibilităților de transformare și anume că, întrucît chiar la imunoelectroforeza serului nativ linia albuminei se prelungește puțin în zona alfa-globulinelor, iar cea a fracțiunii gamma către beta-globuline, aceasta ar însemna că în acele zone s-ar afla produși de transformare ai albuminei și gamma-globulinei. Aceste prelungiri se datoresc, după părerea noastră, trenelor pe care fracțiunile le lasă în urmă, în migrarea lor : albumina, ce se deplasează spre anod, lasă o trenă spre zona alfa, iar gamma-globulinele, care din cauza mobilității electroforetice mici sînt împinse de curentul de electroendosmoză spre catod, lasă o trenă către zona beta. O dovadă ce sprijină această afirmație este aceea că la imunoelectroforeza în gelul de agaroză în care curentul de electroendosmoză și trenele sînt mai slabe decît în cazul gelului de agar, această prelungire este și ea mai puțin marcată.

Pentru întărirea rezultatelor obținute prin determinările imunoelectroforetice am efectuat și determinări cu ajutorul metodei dublei difuzii în gel, după Ouchterlony [19], modificată după cum am arătat chiar în cuprinsul acestei lucrări, în capitolul „Materiale și metode". Albuminele și gamma-globulinele supuse denaturării au fost preparate prin metoda de electroforeză preparativă în gel, elaborată în colaborare cu V. Gheție [17] și descrisă sumar și în lucrarea de față. Albuminele și gamma-globulinele nedenaturate, precum și alfa- și beta-globulinele, ca și fracțiunea D provenind din albumine și gamma-globuline, au fost separate prin microelectroforeză preparativă, după cum am arătat la capitolul de metodică al acestei lucrări și aplicate direct la dubla difuzie, fără a mai fi extrase din gel. Întotdeauna am efectuat controlul fracțiunilor utilizate la determinări.

Pentru a verifica dacă fracțiunea D ce apare în cadrul fenomenului de „omogenizare electroforetică" păstrează caractere antigenice comune cu albuminele și gamma-globulinele de origine, am efectuat determinările prezentate în figura 3. În locașul central am introdus ser imun de iepure antiproteine serice umane (AS). În cele patru locașuri din jur am aplicat albumine nedenaturate (A), gamma-globuline de asemenea nedenaturate (γ), proteine denaturate care se suprapun electroforetic alfa-globulinelor (D_α), respectiv beta-globulinelor (D_β).

Din examinarea figurii se poate vedea că, deși în zona proteinelor denaturate se găsesc și cele provenind din albumine și gamma-globuline,

Între ele nu apare nici o înrudire antigenică, liniile de precipitare întretăindu-se. Aceasta confirmă că prin denaturare, în condițiile arătate, caracterele antigenice ale celor două fracțiuni proteice se modifică complet.

O altă serie de experiențe a avut drept obiectiv să stabilească dacă gamma-globulinele, pe de o parte, și albuminele, pe de alta, capătă în urma termodenaturării, înrudiri antigenice fie cu alfa-, fie cu beta-globulinele. În figura 4 sînt prezentate liniile de precipitare ce se obțin cu alfa-, beta- și gamma-globuline nedenaturate și cu gamma-globuline denaturate prin menținere timp de 30 min la 60°C ($\gamma_{60°}$). Se poate constata că prin denaturare gamma-globulinele nu tind să capete o înrudire antigenică nici cu alfa- și nici cu beta-globulinele.

Imaginea prezentată în figura 5 arată că nici după o denaturare mai avansată, timp de 30 min la 65°C ($\gamma_{65°}$), nu se poate constata o astfel de înrudire. Peste această temperatură, gamma-globulinele în soluția și concentrația folosită de noi încep să se insolubilizeze.

În figurile 6 și 7 sînt prezentate experiențe similare, efectuate însă cu albumină denaturată timp de 30 min la 60°C ($A_{60°}$), respectiv 75°C ($A_{75°}$). Am folosit de data aceasta temperatura de 75°C, deoarece aceasta este temperatura maximă la care albumina — în condițiile noastre de lucru — se mai menține în soluție. Nici de astă dată nu am reușit să sesizăm vreo apropiere antigenică între albumine și alfa- sau beta-globuline, în urma denaturării celor dîntîi.

Un alt fapt de semnalat este că suprapunerea fracțiunii D fracțiunilor alfa și beta nu aduce nici o modificare în numărul sau în intensitatea relativă a liniilor pe care aceste fracțiuni le dau cu serul imun antiproteine serice umane, după cum se poate vedea comparînd figurile 3 cu 5—7. Aceasta arată, o dată în plus, lipsa asemănării antigenice a fracțiunilor denaturate cu vreuna dintre fracțiunile proteice din serul sanguin uman normal.

CONCLUZII

1. Fracțiunea proteică ce apare în cadrul fenomenului de „omogenizare electroforetică" în urma termodenaturării albuminelor și gamma-globulinelor este o fracțiune distinctă de alfa- și beta-globuline, cărora li se suprapune doar ca mobilitate electroforetică. În sprijinul acestei afirmații, aducem următoarele argumente :

a) Diferența în comportarea la coacervare. Spre deosebire de alfa- și beta-globuline, fracțiunea D este complet coacervabilă cu acacia. După îndepărtarea coacervatului prin centrifugare și supunerea supernatantului la o separare electroforetică, reapar fracțiunile alfa- și beta-globulinice, care înainte de coacervare erau complet mascate de fracțiunea D, cu care păreau că se identifică.

b) Cercetări imunochimice au arătat că alfa- și beta-globulinele sînt mai sensibile la denaturare decît albuminele sau gamma-globulinele. Acest fapt face ca existența unei tendințe de transformare prin denaturare a unor fracțiuni mai stabile, cum sînt albuminele sau gamma-globulinele,

în altele mai instabile, cum sînt alfa- și beta-globulinele, să fie greu de acceptat.

c) Imunoelectroforegramele serului sanguin denaturat, efectuate în cadrul lucrării de față, nu indică o intensificare a liniilor de precipitare din zonele alfa sau beta.

d) Determinările efectuate în lucrarea de față cu ajutorul metodei dublei difuzii au arătat și ele lipsa unor caractere antigenice comune între albuminele și gamma-globulinele denaturate, pe de o parte, și alfa- și beta-globuline, pe de altă parte.

2. Noua fracțiune electroforetică apărută în urma termodenaturării albuminelor și gamma-globulinelor nu mai păstrează din caracterele antigenice ale fracțiunilor de origine. Acest fapt este demonstrat pe două căi :

a) Imunoelectroforegrama serului sanguin denaturat, comparată cu aceea a serului normal, nu prezintă prelungirea liniilor de precipitare din zona albuminei sau a gamma-globulinei către zona în care se plasează fracțiunea nou apărută în urma termodenaturării.

b) Determinările prin metoda dublei difuzii nu arată linii de precipitare comune între albumine și gamma-globuline, pe de o parte, și proteinele izolate din zona fracțiunii denaturate suprapusă fracțiunilor alfa- (D_α) și beta-globulinice (D_β) pe de altă parte. De altfel, singurele linii de precipitare care se obțin la D_α și D_β corespund fie alfa-, fie beta-globulinelor, fracțiunea denaturată neavînd capacitatea de a reacționa cu antiserul preparat dacă se folosește ca antigen serul sanguin uman normal.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

Prezentată la redacție
la 26 octombrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Moll L., *Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin*, Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol., **4**, 563 (1904).
2. Troițki G. V., Okulov V. I., *Isledovanie „elektroforeticeskoi gomogenizații" belkov*, Biohimiia, **23**, 601 (1958).
3. Troițki G. V., Okulov V. I., Sorkina D. A., *O vozmojnosti transformații albumina i γ-globulina plazma krovi v α-i β-globulini*, Biohimiia, **26**, 44 (1961).
4. Ardry R., *Recherches électrophorétiques sur le sérum humain chauffé. I. Étude du sérum normal*, Bull. Soc. Chim. Biol., **33**, 236 (1951).
5. Burstein M., Samaille J., *Sur quelques particularités du sérum chauffé*, Rev. Hémat., **10**, 733 (1955).
6. Haurowitz F., *Himiia i biohimiia belkov* (traducere din limba engleză), Inostr. lit., Moscova, 1953, p. 178.
7. Moțet-Grigoraș D., *Contribuții la metoda de cercetare a coacervării proteinelor din serul sanguin uman cu gumă arabică*, St. cerc. biochim. **3**, *3*, 303 (1960).
8. Moțet-Grigoraș D., *Participarea fracțiunilor proteice din serul sanguin uman normal la formarea coacervatului cu gumă arabică*, St. cerc. biochim., **2**, 181 (1959).
9. Moțet-Grigoraș D., *Coacervarea fracțiunilor proteice din serul sanguin uman denaturat prin căldură*, St. cerc. biochim., **4**, *2*, 257 (1961).
10. Idu S. M., Cîmpeanu S., *Electroforeza*, Edit. medicală, București, 1957, p. 57.
11. Hjertén S., *Agarose as an anticonvectional agent in electrophoresis*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 518 (1961).

12. GHEȚIE V., MOȚET-GRIGORAȘ D., *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*. St. cerc. biochim., **5**, 409 (1962).
13. ARAKI C., *Structure of the agarose constituent of agar-agar*, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 543 (1956).
14. HJERTÉN S., *A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis*, Biochim. Biophiys. Acta, **62**, 445 (1962).
15. RUSSELL B., MEAD T. H., POLSON A., *A method of preparing agarose*, Biochim. Biophys. Acta, **86**, 169 (1964).
16. GRABAR P., COURÇON J., *Étude de sérums de cheval, lapin, rat et souris par l'analyse immunoélectrophorétique*, Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 1993 (1958).
17. MOȚET D., GHEȚIE V., *Preparative electrophoresis in agarose gel*, Rev. roum. Biochim., **1**, *2*, 175 (1964); St. cerc. biochim., **7**, 221 (1964).
18. SCHEIDEGGER J. J., *Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1957).
19. OUCHTERLONY O., *Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reaction in correlated systems of diffusion*, Acta Path. Scand., **32**, 231 (1953).
20. WEINER L. M., GOODMAN M., *Salt requirements in agar gel immunoeletrophoresis using chicken antisera*, Fed. Proc., **23**, *2*, 224 (1964).
21. MACOVSCHI E., CARSTEANU M., *Coacervatul dintre proteinele serului sanguin uman și guma arabică*, St. cerc. biochim., **2**, *2*, 111 (1959).
22. MACOVSCHI E., STEOPOE I., CEAUȘESCU S., *Cercetarea structurii coacervatelor prin metoda citologică*, St. cerc. biochim., **5**, *3*, 323 (1962).
23. MOȚET D., *Alteration of antigenous characteristics of proteins in human blood serum owing to thermic denaturation. I. Immunoetrophoretic researches on agarose gel*, Rev. Roum. Biochim., **1**, *3*, 321, (1964); St. cerc. biochim., **7**, *3*, 393, (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 67–69 (1965)

CERCETĂRI ASUPRA PIGMENȚILOR DIN PLANTE ENDEMICE
I. CAROTINOIDELE DIN *ASTRAGALUS PETERFII* *

GAVRIL NEAMȚU, VIRGIL TĂMAȘ și CORNEL BODEA

561.19 : 577.1

Rezumat. — Au fost cercetate carotinoidele din florile plantei endemice *Astragalus peterfii*, care crește în rezervația naturală de la Suatu, regiunea Cluj.

S-a stabilit că florile conțin numeroase carotinoide de tipul α, β și γ-carotinei, pigmentul principal fiind palmitatul de rubixantină.

Rubixantina fusese găsită pînă în prezent în alte plante numai ca pigment secundar.

Din cele aproximativ 4 000 de specii de plante spontane cu flori care cresc în R.P.R., cam 10% reprezintă endemisme [1]. Nu există pînă în prezent cercetări asupra pigmenților din aceste plante, ceea ce ne-a determinat să întreprindem un studiu asupra carotinoidelor din florile lor. În cadrul acestui studiu urmează să fie cercetate natura carotinoidelor, reprezentarea lor cantitativă, precum și corelații biogenetice și fiziologice.

Lucrarea de față se ocupă de carotinoidele din florile de *Astragalus peterfii*. Această plantă endemică crește în rezervația naturală din comuna Suatu, regiunea Cluj. Florile ei sînt slab pigmentate, dar conțin totuși un număr mare de carotinoide.

Interesant este faptul că pigmentul principal este palmitatul de rubixantină. Rubixantina este un derivat monohidroxilat al γ-carotinei, cu gruparea hidroxilică pe inelul β-iononic, care a fost găsită și în alte plante, ca, de exemplu, în diferite specii de Rosa [2] și Cuscuta [3], Tagetes patula [4] și altele, constituind însă în aceste cazuri un pigment secundar. În *Astragalus peterfii* palmitatul de rubixantină este însoțit de alte carotinoide cu structură de α, β și γ-carotină, după cum este arătat în tabela nr. 1.

Identificarea pigmenților s-a făcut prin spectrele lor de absorbție, proba de repartiție și cromatograme de amestec cu pigmenți autentici izolați din alte plante.

În cazul rubixantinei s-a înregistrat și spectrul în IR, atît al esterului cît și al rubixantinei libere. Acest spectru confirmă prezența grupării hidroxilice esterificate, respectiv libere.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba germană.

Din cercetările noastre preliminare asupra carotinoidelor din florile altor specii de Astragalus, cum sînt *Astragalus cicer*, cu flori galben deschis, și *Astragalus onobrychis*, cu flori violete, rezultă că și la aceste

Tabela nr. 1

Carotinoidele din florile de Astragalus peterfii

Carotinoide	Cantitatea în mg/1 000 g material proaspăt	Maximele de absorbție în hexan
a) *cu structură* α		
α-Carotină	1,69	475, 445
Luteină	3,20	475, 445
Dipalmitat de luteină	18,50	474, 444
b) *cu structură* β		
β-Carotină	10,70	482, 450
Criptoxantină	urme	482, 450
Palmitat de criptoxantină	16,8	482, 450
Zeaxantină	1,5	482, 450
Dipalmitat de zeaxantină	2,1	482, 450
c) *cu structură* γ		
γ-Carotină	0,6	493, 460
Palmitat de rubixantină	45,0	494, 462
Licopină sau neolicopină	1,0	500, 470

specii palmitatul de rubixantină este pigmentul principal. Se pare astfel că acest pigment ar fi caracteristic pentru florile genului Astragalus, ceea ce va trebui însă confirmat prin cercetări ulterioare mai ample.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

S-au prelucrat 1 kg flori proaspete, cu 25% umiditate, culese între 15 mai și 1 iunie.

Pentru extragerea pigmenților [5] materialul s-a triturat cu sticlă pisată, s-a extras de mai multe ori cu acetonă, apoi cu amestec de acetonă-eter de petrol. Soluția pigmenților s-a spălat cu apă pentru îndepărtarea acetonei, s-a uscat cu Na_2SO_4 și s-a cromatografiat pe amestec adsorbant MgO-nisip fin (1 : 2 în greutate). Developarea s-a făcut cu amestec de eter de petrol-benzen în care s-a mărit proporția în benzen pînă la 5%.

S-a obținut următoarea cromatogramă (5 ×55 cm; de sus în jos).

0,5	cm	portocaliu	zeaxantină
0,8	cm	galben	luteină
0,2	cm	portocaliu	criptoxantină
0,1	cm	portocaliu-roșu	licopină
5	cm	portocaliu intens	palmitat de rubixantină
1	cm	interzonă	
0,3	cm	portocaliu	dipalmitat de zeaxantină
2	cm	galben	dipalmitat de luteină

1,5	cm	portocaliu	palmitat de criptoxantină
0,2	cm	portocaliu	γ-carotină
2	cm	interzonă	
4	cm	portocaliu	β-carotină
2	cm	interzonă	
1,5	cm	galben	α-carotină

Fiecare pigment a fost separat mecanic, eluat și purificat prin recromatografiere.

Pigmenții purificați au fost dozați colorimetric, folosindu-se ca standard o soluție alcoolică de azobenzen [6].

Identificarea pigmenților s-a făcut după poziția în coloană, cromatogramă de amestec cu carotinoide autentic izolate din diferite plante, prin spectrele de absorbție și prin comportare epi- sau hipo-fazică față de hexan-metanol 95%.

Institutul agronomic, Cluj,
Laboratorul de biochimie

Prezentată la redacție la 17 iulie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. E. Țopa, Natura, **XIII**, *4*, 7 (1960).
2. R. Kuhn, H. Brockmann, Ber. dtsch. chem. Ges., **67**, *339*, 1133 (1934).
3. K. Schön, Biochem. J., *32*, 1566 (1938); L. Zechmeister, W. A. Schroeder, J. Amer. Chem. Soc., **65**, 1535 (1943).
4. P. Karrer, E. Jucker, K. Steinlin, Helv. chim. Acta., **30**, 531 (1947).
5. C. Bodea, E. Nicoară, J. Gross, St. și cerc. științ. (Cluj), V, *1—2*, 73 (1954).
6. R. Kuhn și H. Brockmann, Z. physiol. Chem., **206**, 41 (1932).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 71–75 (1965)

VALOAREA UNOR TESTE BIOCHIMICE PENTRU DIAGNOSTICUL DIFERENȚIAL AL CANCERULUI BRONHOPULMONAR *

EUGENIU PAUNESCU și LUDWIG BERGER

616.23/24–006.6–079.4

Rezumat. — Determinarea hexozaminei serice și a fibrinogenului plasmatic la un lot de 139 de subiecți — 31 normali și 108 cu afecțiuni pulmonare — a permis diferențierea cazurilor de cancer bronhopulmonar (31), care prezintă valori net crescute ale ambelor teste investigate, față de celelalte afecțiuni pulmonare (viroze pulmonare, tuberculoză pulmonară).

În patologia pulmonară actuală, una dintre problemele care se ridică frecvent în fața medicului specialist este diagnosticul diferențial al cancerului bronhopulmonar. În prezent, atît accesibilitatea crescută a populației la controlul medical, cît și depistările active, de masă (în special prin metoda radiofotografică) aduc clinicianului un număr din ce în ce mai mare de cazuri de afecțiuni pulmonare. Dintre acestea, procentul cel mai important îl deține tuberculoza pulmonară, urmată de virozele respiratorii cu localizare pulmonară și de cancerul bronhopulmonar.

Creșterea numărului absolut de cazuri depistate de cancer pulmonar, precum și deplasarea endemiei tuberculoase către vîrstele înaintate, la care frecvența neoplasmelor este mult mai mare, au ridicat problema unui diagnostic diferențial precoce și rapid și au impus astfel lărgirea și ameliorarea mijloacelor de investigație care să poată aduce elemente obiective în sprijinul precizării diagnosticului în afecțiunile pulmonare.

În acest sens, în afara examenelor clinice și radiologice, un accent din ce în ce mai mare s-a pus în ultimii ani pe examenele de laborator, menite să completeze datele necesare diagnosticului diferențial, în special între tuberculoza pulmonară și cancerul bronhopulmonar.

Una dintre componentele serice care s-a demonstrat că reflectă cu multă fidelitate existența unor leziuni extensive, larg distructive, este constituită de mucoproteine — proteine serice conjugate cu carbohidrați, care conțin o proporție de hexozamină ce depășește 4% [5]. Majoritatea autorilor [11], [13], [2] au găsit crescută valoarea serică a acestei componente ori de cîte ori existau leziuni distructive, creșterea fiind în general paralelă cu masivitatea distrucției. Astfel, spre exemplu, în tuberculoza pulmonară evolutivă gravă s-au raportat creșteri ale va-

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba franceză.

lorii mucoproteinelor serice cu 25—40% faţă de normal [7], [4], [1], în timp ce creşterile în cancerul bronhopulmonar se situau în jurul a 50% peste normal [6], [8], [1].

Diferenţele de creştere a valorii mucoproteinelor serice ar putea deci — în principiu — să constituie o indicaţie pentru diagnosticul diferenţial între cancerul bronhopulmonar şi tuberculoză. O analiză mai atentă a semnificaţiei statistice a acestor valori, în funcţie de abaterile de la valoarea medie, arată însă că — într-un număr relativ mare de cazuri — simpla determinare a concentraţiei serice în mucoproteine nu permite diferenţierea între o afecţiune neoplazică şi una tuberculoasă (tabela nr. 1).

O serie de lucrări — consemnate de Schulz [10] — au semnalat o creştere a valorilor fibrinogenului sanguin în afecţiunile neoplazice, modificare ce nu are loc în tuberculoză.

Apare în felul acesta posibil să se asocieze estimarea mucoproteinelor serice cu cea a fibrinogenului sanguin, ca test biochimic în vederea diferenţierii cancerului bronhopulmonar de alte afecţiuni pulmonare, printre care tuberculoza.

Tabela nr. 1

Valoarea medie a concentraţiei serice în mucoproteine, în diferite afecţiuni

Lotul de subiecţi investigaţi	Concentraţia mucoproteinelor exprimată în mg tirozină la 100 ml ser [8]			Concentraţia mucoproteinelor exprimată în mg hexozamină la 100 ml ser [1]		
	Nr. cazuri	Valori	Semnific. diferenţei	Nr. cazuri	Valori	Semnific. diferenţei
Subiecţi normali	37	3,025±0,65	semnificativă	29	83±4,6	semnificativă
Tuberculoză gravă, tumori benigne etc.	10	4,74±1,52		43	106±11,2	
Cancer bronhopulmonar	114	5,79±1,39	nesemnificativă	52	125±19,8	nesemnificativă

În această notă prezentăm rezultatele obţinute în cadrul investigării mucoproteinelor şi fibrinogenului sanguin la un lot de 139 de persoane, dintre care: 31 de subiecţi normali, 28 de foşti bolnavi de tuberculoză, 29 de bolnavi de tuberculoză, 20 de bolnavi cu viroze pulmonare şi 31 de neoplazici pulmonari confirmaţi.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru *estimarea mucoproteinelor* am preferat metoda Morgan-Elson, modificată de Rimington [9], care permite determinarea mucoproteinelor prin dozarea hexozaminei liberate după hidroliză. Această metodă dă, în general, valori superioare în comparaţie cu metoda de estimare a mucoproteinelor prin tirozina liberată după hidroliză [12], însă este preferabilă pentru accesibilitatea ei într-un număr mare de laboratoare clinice din teren.

În condiţiile noastre, am utilizat următoarea tehnică: într-un balon adaptabil la refrigerentul de reflux, se introduc 0,5 ml ser de analizat, 3,4 ml apă distilată şi 2 ml HCl 3 N

Amestecul se supune unei hidrolize de 2 ore la 100° C, la reflux, apoi se neutralizează cu 1,5 ml NaOH 3N. Se aduce volumul total la 8 ml, se filtrează prin hîrtie de filtru şi din filtrat se iau 2 ml într-o eprubetă. Se adaugă 2 ml apă distilată şi 2 ml reactiv acetil-acetonă (proaspăt preparat prin dizolvarea a 1 ml acetil-acetonă în 25 ml soluţie 5,6 g% Na_2CO_3). Se astupă eprubeta cu un dop de vată şi se lasă exact 20 min într-o baie cu apă clocotindă. După răcire, se adaugă 4 ml alcool etilic 96% şi 2 ml reactiv Ehrlich[1], agitîndu-se de fiecare dată. După exact 45 min se citeşte la fotometru intensitatea culorii dezvoltate, utilizîndu-se un filtru de 550—590 μm. Valoarea obţinută se multiplică cu 8 şi concentraţia în probă se citeşte direct pe curba etalon, în prealabil trasată.

Fibrinogenul plasmatic a fost determinat prin metoda Foster-Whipple modificată [3]. Plasma se obţine prin centrifugarea sîngelui (9 părţi) recoltat pe o soluţie 3,6% de citrat de sodiu (1 parte). La 2 ml plasmă se adaugă 0,07 ml soluţie 5% de clorură de calciu şi se incubează o oră la 37°C. Coagulul format se culege cu o baghetă, se usucă la exsicator şi se cîntăreşte.

REZULTATE

Rezultatele obţinute la cei 139 de subiecţi investigaţi sînt consemnate în tabela nr. 2 (valori medii, exprimate în mg/100 ml de ser sau plasmă).

Tabela nr. 2

Valorile mucoproteinelor serice şi fibrinogenului la cei 139 de subiecţi testaţi (mg/100 ml ser sau plasmă)

Caracterul lotului	Valori medii ale mucoproteinelor (exprimate în hexozamină)	Valori medii ale firbinogenului
31 subiecţi normali	61,8 ±8,2	362 ±65,2
28 foşti bolnavi tbc.	55,3 ±7,6	406,1±2,01
18 viroze pulmonare cu imagini radiologice dubioase	68,92±8,1	366,6±39,7
29 de tuberculoze pulmonare evolutive	99,38±14,32	422,6±40,6
1 metastază pulmonară confirmată (fals negativă)	84	444
2 viroze pulmonare cu hepatită în antecedente şi probe hepatice pozitive (falşi pozitivi)	55,2 82,3	810 711
30 de neoplasme pulmonare confirmate	118,06±12,3	789,20±82,4

După cum se observă din tabela nr. 2, cu excepţia a 3 cazuri, toate celelalte 136 se pot grupa după cum urmează :

	mucoproteine	*fibrinogen*
a) viroze pulmonare	moderat crescute	normal
b) tuberculoză pulmonară evolutivă	crescute	normal
c) cancer bronhopulmonar	mult crescute	crescut

[1] 0,8 g *p*-dimetilaminobenzaldehidă, dizolvate în 30 ml alcool etilic 96% şi 30 ml HCl concentrat. Se păstrează în sticlă brună, închisă cu dop rodat.

Caracterele diferite ale acestor grupe permit diferenţierea cancerului bronhopulmonar de celelalte afecţiuni pulmonare (viroze, tuberculoză) cu care poate fi confundat. În felul acesta, pe baza unor teste relativ simple — determinarea hexozaminei serice şi a fibrinogenului sanguin —, se poate sprijini un diagnostic diferenţial al cancerului bronhopulmonar.

În cazul cînd rezultatele obţinute de noi vor fi confirmate şi de alţi cercetători, pe un număr de cazuri suficient de mare, considerăm că se poate recomanda, ca o investigaţie de laborator curentă, determinarea hexozaminei şi a fibrinogenului sanguin în vederea diferenţierii cancerului bronhopulmonar de alte afecţiuni pulmonare.

Cele trei cazuri (tabela nr. 2) care nu se pot grupa în schema propusă mai sus s-au dovedit — la o investigaţie mai atentă — că prezintă unele particularităţi care pot constitui cauze ale excepţiei. Acesta este, spre exemplu, cazul celor doi subiecţi cu viroze pulmonare care au avut valori crescute ale fibrinogenului şi au prezentat în antecedente hepatită relativ recentă şi probe hepatice pozitive. În ceea ce priveşte cazul cu metastază pulmonară, valoarea cvasinormală a fibrinogenului poate fi pusă pe seama unei areactivităţi generale a organismului, aflat în fază de caşexie.

CONCLUZIE

Investigarea mucoproteinelor serice şi a fibrinogenului la un bolnav depistat cu leziuni distructive pulmonare întinse poate constitui un ajutor preţios pentru precizarea diagnosticului şi, în special, pentru diferenţierea cancerului bronhopulmonar de alte afecţiuni pulmonare. Într-adevăr, cancerul bronhopulmonar prezintă valori crescute ale ambelor componente investigate, în timp ce tuberculoza, virozele, tumorile benigne se însoţesc numai de creşterea mucoproteinelor.

Laboratorul de biochimie şi fiziologie bacteriană
al Institutului clinic de ftiziologie
Bucureşti, Şos. Viilor 90

Prezentată la redacţie
la 11 noiembrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Bahnidi E., Osvath A., Marcz I., *Über biochemische Fernwirkung verschiedener Lungenkrankheiten im Hinblick auf die Differentialdiagnostik der Tumoren*, Ztsch. Tbk., *120*, 14 (1963).
2. Edward D. W., *Seromucoid values in patients undergoing Hincostarch therapy*, Am. Rev. Tuberc., *78*, 131 (1958).
3. Georgescu P., Păunescu Eug., *Biohimiceskie metodi diagnoza i issledovania*, Meditinskoe izdatelstvo, Bucureşti, 1964.
4. Lawrence S. H., Weimer H. E., Salkin D., *Serial serum glycoprotein studies in pulmonary tuberculosis*, J. lab. Clin. Med., *51*, 935 (1958).
5. Meyer K., *Mucoid and glycoproteins*, Adv. in Protein chemistry, 2, 249 (1945).
6. Musajo A., Mariotti A., *Ricerche sulle glicoproteine del siero di portatori de neoplasie maligne*, Gaz. Intern. Med. Chir., *16*, 2344 (1958).

7. Pilheu J. A., Iannello J. A., Bonacossa R., Willson J., *Serum proteins in pulmonary tuberculosis*, Dis. Chest., *41*, 173 (1962).
8. Pilheu J. A., Iannello J. A., Willson J., *Serum mucoproteins in pulmonary tuberculosis and in bronchopulmonary cancer*, Dis. Chest, *45*, 163 (1964).
9. Rimington C., *A modification of Elson and Margan method of hexozamine estimation*, Biochem, J., *34*, 931 (1940).
10. Schulz F. H., *Das Fibrinogen*, G. Thieme Verlag, Leipzig, 1953.
11. Seibert F. B., Seibert M. V., Atno A. J., Campbell H. W., *Variation in protein and polysaccharide content of sera in the chronic diseases, tuberculosis, sarcoidosis and carcinoma*, J. Clin. Invest., *26*, 90 (1947).
12. Winzler R. J., Devor A. W., Mehl J. W., Smyeh I. M., *Studies on mucroproteins of human plasma*, J. Clin. Invest., *27*, 609 (1948).
13. Winzler R. J., Smyth I. M., *Plasma mucropotein levels in cancer patients*, J. clin. Invest., *27*, 617 (1948).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 77–79 (1965)

ACȚIUNEA NARCOZEI ASUPRA NIVELULUI FOSFOCREATINEI DIN MUȘCHI *

TRAIAN RĂDULESCU și DITA COTARIU

612.817.2

Rezumat. — S-a pus în evidență creșterea fosfocreatinei din mușchi sub acțiunea eterului etilic și a novocainei. S-a stabilit astfel că narcoza produce același efect ca și denervarea sau curarizarea, stări ce se caracterizează prin absența controlului nervos.

Este cunoscut faptul că prin curarizarea și denervarea mușchiului *in situ* se produce o creștere a nivelului fosfocreatinei. Narcotizarea, reducînd reacția mușchiului la stimularea nervoasă, poate fi considerată ca o stare funcțională similară și, prin urmare, este de așteptat să determine la rîndul ei o modificare asemănătoare.

În legătură cu aceasta, E. Macovschi și C. Iordache [1], studiind comportarea mușchiului de broască în curarizare și narcoză cu eter etilic, au pus în evidență în ambele cazuri o scădere a fosfatului anorganic liber din mușchi. Acest rezultat poate fi interpretat ca o consecință a participării directe sau indirecte a fosfatului anorganic la sinteza fosfocreatinei. Într-adevăr, valorile acesteia, obținute de autorii menționați după tehnica lui K. Lohmann [2] din diferența între fosforul determinabil direct și fosforul anorganic, confirmă creșterea nivelului fosfocreatinei în curarizare, dar nu și în narcoza cu eter etilic, pentru care aceste valori se mențin în limitele normale. Totodată, acești autori semnalează o scădere considerabilă a fosforului determinabil direct. Această constatare este importantă, deoarece valorile fosfocreatinei obținute după metoda indicată sînt derivate tocmai din cele ale fosforului determinabil direct.

O comportare diferită a mușchiului în narcoză a fost pusă în evidență și de noi. Astfel, în timp ce curarizarea și denervarea determină o scădere accentuată a fosfatului anorganic difuzat din mușchiul introdus într-o soluție Ringer [3], [4], narcotizarea cu novocaină în anumite condiții este însoțită de o creștere a fosfatului difuzat [5]. Determinarea pe cale directă a fosfocreatinei în mușchiul narcotizat cu eter etilic și novocaină poate aduce lămuriri în acest caz. Această cercetare face obiectul lucrării de față.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba engleză.

Experienţele au fost executate pe muşchi gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) *in situ*. S-a lucrat pe loturi de broaşte normale şi narcotizate. Narcoza cu eter etilic s-a obţinut prin menţinerea broaştei timp de 30 min sub un clopot de sticlă, în prezenţa unui tampon de vată îmbibat totdeauna cu aceeaşi cantitate de eter etilic. După acest interval de timp, suficient pentru relaxarea totală, se tăiau simultan picioarele posterioare şi se îngheţau în azot lichid. Narcoza cu novocaină s-a efectuat injectîndu-se în sacii dorsali 1 ml clorhidrat de novocaină 0,5%. După 60 min de la injectare, cînd relaxarea era totală, se tăiau simultan picioarele posterioare şi se proceda ca mai sus.

Acţiunea novocainei s-a urmărit şi prin compararea valorilor fosfocreatinei din muşchii gastrocnemieni simetrici ai broaştei narcotizate. În acest caz, unul dintre muşchii gastrocnemieni era scos de sub acţiunea novocainei prin legarea piciorului respectiv, aşa cum s-a arătat cu altă ocazie [5].

Dozarea fosfocreatinei s-a făcut după metoda A. M. Alekseeva [6]. Valorile fosfocreatinei înscrise în tabelele de mai jos sînt exprimate în creatinină; ele reprezintă media obţinută pe muşchii simetrici.

Menţionăm că valorile pentru fosfocreatină din muşchii gastrocnemieni simetrici normali şi narcotizaţi sînt practic concordante.

Tabela nr. 1

Fosfocreatina din muşchii gastrocnemieni de broască normală şi narcotizată cu eter etilic (în mg creatinină/g muşchi). Durata narcozei 30 min; muşchi normal = M; muşchi sub acţiunea eterului etilic = E.

M	E
1,52	2,57
1,11	1,56
1,06	2,32
1,09	1,14
0,75	1,85
1,31	1,89
1,24	1,97
1,30	1,64
1,12	1,28
0,99	1,04
Valoarea medie 1,15	1,72

$D = 0,57$

$D_{0,05} = 0,14$

Tabela nr. 2

Fosfocreatina din muşchii gastrocnemieni de broască normală şi narcotizată cu novocaină (în mg creatinină/g muşchi). Tăierea picioarelor la broasca narcotizată s-a făcut la 60 min după injectare. Muşchi normal = M; muşchi sub acţiunea novocainei = N.

M	N
1,26	1,79
1,41	2,16
1,38	2,20
1,06	2,14
0,79	1,99
1,31	2,26
1,24	1,07
1,30	1,75
1,12	1,30
0,99	1,19
Valoarea medie 1,18	1,78

$D = 0,60$

$D_{0,05} = 0,11$

După cum reiese din tabelele nr. 1 şi 2, valoarea medie a fosfocreatinei musculare, corespunzătoare loturilor de broaşte narcotizate cu eter etilic sau novocaină este mai mare decît cea a lotului de broaşte normale.

Cu ajutorul unei tehnici utilizate de noi anterior, s-a putut urmări efectul novocainei chiar pe aceeaşi broască. Din tabela nr. 3 reiese că

valoarea fosfocreatinei din mușchiul narcotizat este totdeauna superioară celei din mușchiul simetric normal. Se dovedește astfel că narcoza determină o creștere a nivelului fosfocreatinei din mușchi și că diferența de comportare în această privință pusă în evidență de E. Macovschi și C. Iordache este numai aparentă.

Într-adevăr, dacă ținem seama că datele din literatură menționează creșterea permeabilității pentru fosfat a țesuturilor aflate sub acțiunea narcoticelor [7], nu este exclus ca mușchiul gastrocnemian *in situ* al broaștei narcotizate să piardă prin difuzie o parte din conținutul în fosfat anorganic. Pierderea de fosfat, componentă a fosforului determinabil direct, va determina scăderea acestuia și, implicit, și a fosfocreatinei obținute după tehnica lui K. Lohmann.

Rezultatele noastre privind nivelul fosfocreatinei musculare confirmă deci ipoteza inițială a unei comportări similare a mușchiului în curarizare, denervare și narcotizare.

Tabela nr. 3

Fosfocreatina din mușchii gastrocnemieni de broască narcotizată cu novocainǎ (în mg creatininǎ/g mușchi). Un mușchi este sub acțiunea novocainei; mușchiul simetric, izolat prin legare, este normal. Mușchi normal (picior legat) = M; mușchiul sub acțiunea novocainei = N.

M	N
1,03	1,97
1,46	2,40
0,89	1,84
1,49	1,65
1,13	1,74
1,09	1,68
1,20	1,80
1,38	1,86
Valoarea medie 1,21	1,87

D = 0,66

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

Prezentată la redacție la 30 octombrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, C. Iordache, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului*, St. cerc. biochim. **4**, *2*, 207—218 (1962).
2. K. Lohmann, *Über die Isolierung verschiedener natürlichen Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit*, Biochem. Z., **194**, 306 (1928).
3. Tr. Rădulescu, D. Cotariu, L. Scolnic, *Fosforul anorganic și exosmoza lui din mușchi în diferite stări de excitabilitate și efort*, St. cerc. biochim., **7**, *1*, 97—104 (1964).
4. Tr. Rădulescu, L. Scolnic, *Exosmoza fosfatului anorganic în diferite stări funcționale ale mușchiului*, St. cerc. biochim., **7**, *2*, 237—242 (1964).
5. Tr. Rădulescu, D. Cotariu, *Exosmoza fosfatului anorganic din mușchi în narcoză și mișcare pasivă*, St. cerc. biochim. **7**, *2*, 243—247 (1964).
6. A. M. Alexeeva, *K voprosu o prevrașcenii kreatinfosfata u kreatinin i o novom metode opredelenia kreatinfosfata*, Biohimiia, **16**, *2*, 97—103 (1951).
7. H. Lange, N. Henning, *Weitere Untersuchungen an überlebenden Tumorschnitten*, Arch. f. Exp. Path. u. Pharm., **131**, 119 (1928).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 81 – 83 (1965)

OBSERVAȚII REFERITOARE LA SCHIMBUL IZOTOPIC ÎNTRE AMINOACIZII IODAȚI ȘI ^{131}I PE HÎRTIA CROMATOGRAFICĂ*

I. SZANTAI, Z. URAY și V. KOVACS

615.84

Rezumat. — Autorii semnalează posibilitatea obținerii de aminoacizi iodați marcați cu radioiod prin schimb izotopic direct pe hîrtia cromatografică, între tirozină, diiodtirozină, triiodtirozină și histidină, pe de o parte, și ^{131}I, pe de altă parte, atunci cînd aceste substanțe se întrebuințează ca martori radioactivi pentru identificarea radiocromatogramelor compușilor tiroidieni marcați cu ^{131}I. În același timp se constată posibilitatea unui schimb izotopic între radioiodul mineral prezent în extractele butanolice ale compușilor tiroidieni radiomarcați cu ^{131}I și antrenorii inactivi folosiți în procesul de extracție.

Problema schimbului izotopic între atomul ^{127}I al aminoacizilor iodați și ^{131}I mineral, în diverse condiții experimentale, a format obiectul a numeroase cercetări [6] [7] [9]. Această reacție este deosebit de importantă pentru cercetarea hormonilor tiroidieni, deoarece oferă aminoacizi marcați cu ^{131}I, ușor sintetizabili, care pot fi folosiți ca termen de comparație la identificarea pe radiocromatograme a compușilor tiroidieni ^{131}I [4] [10].

În procesul de identificare s-au folosit compuși tiroidieni inactivi, adăugați la extractul tiroidian radioactiv. Localizarea aminoacizilor iodați nemarcați din amestecul standard s-a obținut prin developarea cromatogramelor cu ninhidrină. Identificarea pe cromatograme a compușilor tiroidieni marcați cu radioiod s-a efectuat prin suprapunerea radiocromatogramelor pe cromatogramele clasice, obținute cu aminoacizi iodați nemarcați (fig. 1).

Analizînd cromatogramele efectuate în modul descris mai sus, s-a constatat că pe radiocromatograme, în porțiunea semisuprapunerii, intensitatea benzii corespunzătoare iodului mineral radioactiv scade, pe cînd în același timp imaginea sa radiocromatografică apare la nivelul compușilor tiroidieni nemarcați.

Acest fenomen ne-a atras atenția asupra posibilității de a marca aminoacizii iodați prin schimb izotopic cu ^{131}I direct pe cromatogramă, sintetizîndu-se astfel substanțele marcate cu radioizotop.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim. 2, 1 (1965), în limba franceză.

Cercetările au fost efectuate cu două sisteme de solvenţi :

A) n-butanol + NH_4OH 2N (40 : 40) ;

B) n-butanol + acid formic + apă distilată + alcool etilic (40 : 10 : 40 :2).

Aminoacizii cercetaţi au fost aplicaţi pe hîrtia cromatografică în cantitate de 200 μg, pe o linie de 6 cm. După uscarea cromatogramelor, pe aceeaşi linie s-a aplicat radioiodul, în cantitate de 10 000 de impulsuri/min, activitatea acestuia determinîndu-se cu ajutorul contorului GM VAZ 320, în contact cu hîrtia cromatografică. După 2 ore de saturare şi după o cromatografiere de 16—20 de ore, cromatogramele au fost uscate şi apoi s-au obţinut radiocromatogramele corespunzătoare.

Cu ajutorul acestei metode s-au cercetat : diiodtirozina şi tiroxina, ca aminoacizi iodaţi nemarcaţi, şi tirozina şi histidina, ca aminoacizi neiodaţi.

Observaţiile noastre referitoare la schimbul izotopic dintre iodul inactiv şi radioiod, ca şi dintre hidrogen şi ^{131}I, se pot rezuma schematic astfel :

$$Ax + Bx^{x} \rightarrow Ax^{x} + Bx$$

1. $\text{Tirozina} + Na^{131}I \rightarrow M^{131}IT + D^{131}IT$

2. $MIT + Na^{131}I \rightarrow M^{131}IT + NaI$

3. $DIT + Na^{131}I \rightarrow D^{131}IT + NaI$

4. $Tx + Na^{131}I \rightarrow Tx^{x} + NaI$

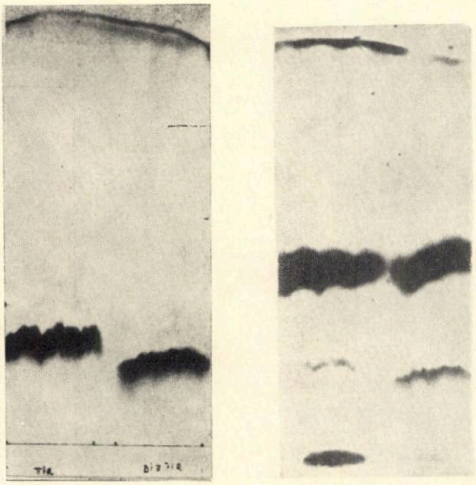
În aceleaşi condiţii experimentale şi în mediu bazic nu s-a obţinut un schimb izotopic între alţi acizi aminaţi şi radioiodul mineral.

Lucrînd într-un sistem de solvent acid (n-butanol + acid formic + apă distilată + alcool etilic 40 : 10 : 40 : 2), în afara schimburilor mai sus arătate s-a mai constatat un schimb izotopic între radioiod şi atomii de hidrogen ai histidinei ; s-au obţinut astfel compuşi iodaţi ai histidinei, reprezentaţi prin cinci fracţiuni a căror identificare este în curs (fig. 5).

Avînd în vedere dificultăţile întîmpinate în utilizarea metodei amestecului standard suprapus la identificarea aminoacizilor sulfuraţi, s-a folosit metoda amestecului standard semisuprapus (12), care a uşurat în mod simţitor procesul de identificare (fig. 6).

S-a utilizat aceeaşi metodă pentru identificarea compuşilor iodaţi tiroidieni marcaţi cu ^{131}I, combinînd metoda marcării aminoacizilor iodaţi prin schimb izotopic.

Schimbul izotopic dintre tirozină, diiodtirozină, triiodtirozină, tiroxină şi radioiodul mineral, care are ca rezultat formarea de aminoacizi marcaţi cu ^{131}I, ridică o serie de probleme în legătură cu metoda de extragere a compuşilor tiroidieni marcaţi cu radioiod, în cazul cînd se folosesc antrenori marcaţi (3), avînd în vedere posibilitatea de marcare a compuşilor nemarcaţi cu iodul radioactiv mineral prezent întotdeauna în extracţiile butanolice.



a *b*

Fig. 1. — *a*) Cromatograma MIT și DIT obținută cu ajutorul metodei ascendente, cu solventul n-butanol + NH_4OH 2N, pe hîrtie Whatman nr. 1, după developare cu ninhidrină. *b*) Radiocromatograma obținută prin autoradiografia cromatogramei *a*.

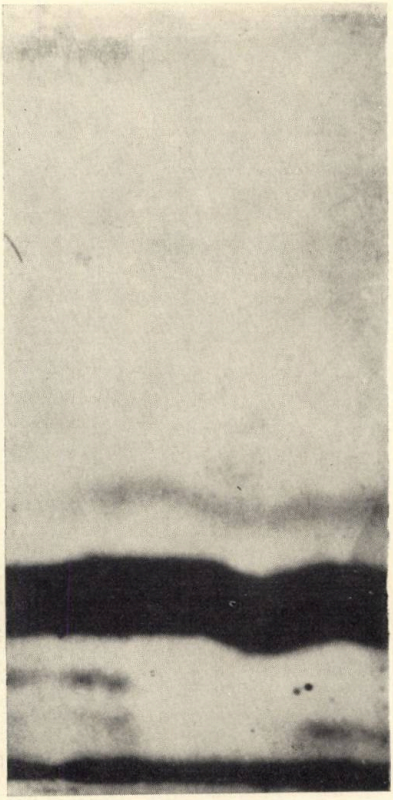


Fig. 2. — Schimb izotopic pe hîrtia cromatografică în timpul pregătirii cromatogramei, între ^{131}I — — — H. tirozină și ^{131}I — — — ^{127}I-diiodtirozină
Solvent : n-butanol + NH_4OH 2N.

Fig. 3 Fig. 4 Fig. 5 Fig. 6

Fig. 3. — Schimb izotopic în timpul pregătirii cromatogramei, între ^{131}I ——— tirozină. Solvent : n-butanol + acid formic + apă distilată + alcool etilic (40 : 10 : 40 : 2).

Fig. 4. — Schimb izotopic în timpul pregătirii cromatogramei, între ^{131}I ——— tirozină Solvent : n-butanol + NH_4OH 2N.

Fig. 5. — Radiocromatograma metaboliţilor urinari ai metioninei ^{35}S, obţinută prin metoda ascendentă, cu solventul n-butanol + acid formic + apă distilată + alcool etilic (40 : 10 : 40 : 2), pe hîrtie Whatman nr. 1, folosind pentru identificare metoda standardului semisuprapus.

Fig. 6. — Schimb izotopic în timpul pregătirii cromatogramei, între ^{131}I ——— H-histidină. Solvent : n-butanol + acid formic + apă distilată + alcool etilic (40 : 10 : 40 : 2).

CONCLUZII

1. Există posibilitatea obținerii de aminoacizi iodați marcați cu radioiod prin schimb izotopic direct pe hîrtia cromatografică între tirozină, diiodtirozină, triiodtirozină și histidină, pe de o parte, și ^{131}I, pe de altă parte, atunci cînd aceste substanțe se întrebuințează ca martori radioactivi pentru identificarea radiocromatogramelor compușilor tiroidieni marcați cu ^{131}I.

2. În același timp există posibilitatea unui schimb izotopic între radioiodul mineral prezent în extractele butanolice ale compușilor tiroidieni radiomarcați cu ^{131}I și antrenorii inactivi folosiți în procesul de extracție.

Secția de medicină nucleară, I.M.F. Cluj

Prezentată la redacție
la 20 octombrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Balogh I. R., Kertes P., Acta Med. Acad. Sci. Ung., **XIV**, 2 (1963).
2. Beraud Th., *Études biochimiques des hormones tyroidiennes en pathologie humaine*, teză, Lausanne (1960).
3. Berger M., Pexriu J., Ann. d'Endocr., Paris, **18**, 402 (1957).
4. Gross I., Pitt Rivers, Lancet, 1952, 439.
5. Hais I. M., Macsek S., *Cromatografia pe hîrtie*, București, 1961.
6. Ionescu S., *Elemente de radiochimie*, Edit. tehnică, București, 1959.
7. Marcu Gh., *Chimia elementelor radioactive*, Edit. did. pedag., București, 1962.
8. Mayniel G., Blanquet P., Estibott M., Bull. Soc. Chim. Biol., **23**, 404 (1952),
9. Murin A. N., *Radiochimia și chimia proceselor nucleare*, Edit. tehnică, București (1963).
10. Roche I., Lissitzky S., Michel R., Methods of Biochem., Anal. I—II, Interscience, New York (1954).
11. Szántai I., Lucrările științifice, I.M.F., Cluj, **I** (1956).
12. Szántai I., Uray Z., Fărcășanu M., Kovacs V., Simpozionul de chimie al Univ. „Babeș-Bolyai", Cluj (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 85 – 88 (1965)

METODĂ RAPIDĂ DE DETERMINARE A INDICELUI DE CONVERSIUNE A IODULUI MINERAL ÎN IOD PROTEIC MARCAT CU ^{131}I *

I. SZÁNTAI, Z. URAY şi T. HOLAN **

578.3

Rezumat. — Pentru testarea funcţiei tiroidiene cu ^{131}I, determinarea hormonilor tiroidieni elaboraţi are o importanţă deosebită. De aceea s-a încercat standardizarea unei aparaturi şi metode, folosindu-se răşini schimbătoare de ioni, care prezintă avantaje faţă de metodele de precipitare folosite în general de majoritatea unităţilor de medicină nucleară. S-a lucrat cu răşina Merck II tip anionit B.S., pregătită sub formă Cl^-. Controlul tehnicii s-a făcut prin compararea rezultatelor cu cele obţinute prin metoda precipitării şi prin probe succesive ale aceleiaşi plasme, pe aceeaşi răşină. Valorile obţinute prin cele două metode sînt foarte apropiate, iar timpul de determinare a indicelui de conversiune al iodului mineral în iod proteic este scurtat cu peste 50%.

Determinarea procentajului de transformare a iodului anorganic în iod legat proteic, cunoscut sub termenul de „indice de conversiune" (I.C.), ocupă un loc important în diagnosticul diferenţial al afecţiunilor tiroidiene.

Tehnica de determinare a indicelui de conversiune, propusă de Clark şi colab. [2], prin precipitarea ^{131}I legat proteic cu acid tricloracetic, pe lîngă faptul că este laborioasă şi necesită un timp de execuţie destul de îndelungat, prezintă şi o serie de alte dezavantaje. Astfel, nerespectarea turaţiei şi a timpului de centrifugare, insuficienţa sau numărul prea mare de spălări cu acid tricloracetic duc la modificarea rezultatelor [6]. La enumerarea surselor de erori poate fi adăugată şi deiodarea hormonilor tiroidieni în mediu acid, viteza deiodării fiind proporţională cu timpul executării determinărilor, care, la rîndul său, variază cu numărul probelor de executat.

În scopul aplicării unui procedeu mai rapid şi mai precis de determinare a ^{131}I legat de proteine, metodele de precipitare au fost înlocuite cu tehnici utilizînd răşini schimbătoare de ioni [1] [3] [4] [5] [7].

Ţinînd seama de constantele fizico-chimice ale răşinilor schimbătoare de ioni de tip „bază slabă", care la pH 7 şi peste 7 au o capacitate de fixare slabă, din cauza disociaţiei mici, aceste lucrări au fost executate cu

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 2 (1965), în limba franceză.

** Colaborare tehnică: I. Kendeffy.

anioniţi de tip „bază tare" şi „foarte tare". Avînd însă în vedere faptul că anioniţii de tip „bază slabă" (B.S.) au o mili echivalenţă dublă faţă de anioniţii de tip „bază tare" (B.T.) sau „foarte tare" (B.F.T.), iar pH-ul sîngelui este 7,2—7,4, ne-am propus experimentarea paralelă a anionitului Merck II de tip B.S., în comparaţie cu diferiţi anioniţi de tip B.F.T. şi B.T., pentru utilizarea sa la determinarea indicelui de conversiune al iodului mineral în iod legat proteic. În acest scop s-a confecţionat un dispozitiv pentru efectuarea rapidă a acestor lucrări.

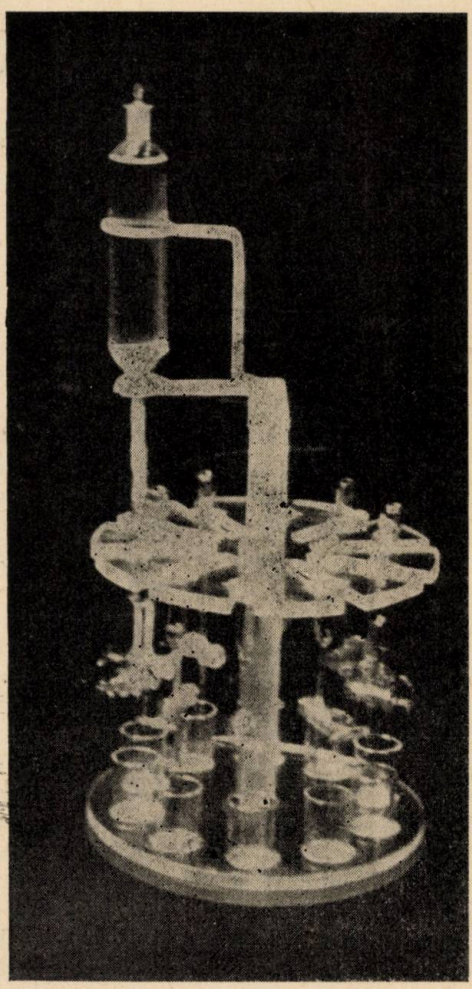


Fig. 1. — Dispozitiv de manipulare a microcoloanelor conţinînd răşini schimbătoare de ioni.

METODA DE LUCRU

Pentru experimentarea anionilor de diferite tipuri şi pentru determinarea rapidă a indicelui de conversiune s-a confecţionat un dispozitiv simplu de manipulare a microcoloanelor conţinînd răşini schimbătoare de ioni (fig. 1).

Microcoloanele de sticlă, fixate pe dispozitivul mai sus prezentat, au forma unor pîlnii, cu un volum de 6 ml, prezentînd la partea inferioară o prelungire în formă de tub de 4 × 50 mm, în care se află răşina. Reglarea trecerii plasmei este asigurată de un robinet de sticlă, dispus la extremitatea inferioară a microcoloanei. S-au executat o serie de experienţe cu anioniţii Merck III, Dowex I, Amberlite 400, Amberlite 410, 20 — 50 mesh, pregătiţi sub forma de Cl^- şi OH^-, comparativ cu anionitul Merck II tip B.S. Răşinile pregătite sub forma OH^-, cu toate că schimbă ionii I^-, nu dau rezultate satisfăcătoare, deoarece prin schimb de ioni modifică echilibrul electrolitic al plasmei, cauzînd precipitarea proteinelor. Această precipitare nu apare însă la anioniţii pregătiţi sub forma Cl^-, care, datorită constantelor lor fizico-chimice, schimbă în mod cantitativ I^-.

Pentru a compara rezultatele determinării „indicelui de conversiune" obţinute cu metoda schimbătorilor de anioni de diferite tipuri cu cele obţinute prin metoda precipitării, s-a procedat în felul următor: s-a injectat unui cîine ^{131}NaI intramuscular în doză de 10 mC/kg corp. După 24 de ore s-au recoltat din artera femurală 100 ml de sînge, pe 1 ml heparină. În plasma obţinută după centrifugare s-a determinat indicele de conversiune cu anioniţi de diferite tipuri. În tabela nr. 1 sînt prezentate aceste rezultate, în comparaţie cu valorile obţinute prin metoda precipitării.

Tabela nr. 1

Răşina	Schelet	Gruparea activă	Capacitate		Forma preg.	I.C. (%)
			mval/g	mval/ml		
Amberlite IRA 400 tip B.F.T.	polistirol	$-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	3,3	1,2	Cl^-	4,5
Amberlite IRA 410 tip B.T.	polistirol	$-\overset{+}{N}R_2R_1$	3,1	1,35	Cl^-	4,6
Ionenaustauscher Merck III tip B.T.	polistirol	$-\overset{+}{N}R_2R_1$	3,5	—	Cl^-	5,4
Ionenaustauscher Merck II tip B.S.	polistirol	$-NHR$ $-NR_2$	6,0	—	Cl^-	5,0
Precipitare cu acid triclor-acetic	—	—	—	—	—	5,6

REZULTATE

Examinînd datele prezentate în tabela nr. 1, se constată că, indiferent de tipul anionitului utilizat, valorile obţinute sînt foarte apropiate.

În vederea verificării sensibilităţii metodei, s-a blocat tiroida animalului de experienţă cu preparate sulfamidice, pentru a se obţine o elaborare hormonală redusă. Determinînd valoarea indicelui de conversiune cu ajutorul diferitelor răşini schimbătoare de ioni, pregătite sub forma Cl^-, în aceste condiţii, s-au obţinut rezultatele din tabela nr. 2.

Tabela nr. 2

Tipul răşinii schimbătoare de ioni	Indicele de conversiune (%)
Wofatit (industrial)	2
Merck II Ionenaustauscher	0,85
Merck III Ionenaustauscher	0,90
Dowex I	0,90
Amberlite IRA 410	1,00
Amberlite 400	1,00
Controlul cu metoda precipitării	0,80

Pe baza rezultatelor obţinute se poate trage concluzia că, în aceste condiţii, anioniţii de tip bază slabă dau la pH 7,2—7,4 al sîngelui aceleaşi rezultate ca şi anioniţii de tip B.T. şi B.F.T., schimbînd cantitativ anionii acizilor tari. Acest lucru înseamnă că, pe baza calculelor stoichiometrice, se poate lucra cu o cantitate de 5 ml ser, utilizîndu-se 0,2 g anionit Merck II. Astfel este posibilă întrebuinţarea microcoloanelor, evitîndu-se diluarea plasmei prin lichidul de spălare folosit în cantităţi ridicate ; în acest fel se evită şi tasarea coloanei cu răşină, ceea ce în cazul utilizării anioniţilor de tip B.F.T. şi B.T. nu este posibil, din cauza cantităţilor ridicate de răşină necesare pentru fixarea anionilor plasmatici.

Reproductibilitatea rezultatelor s-a verificat efectuîndu-se 6 determinări paralele pe aceeaşi răşină, la aceleaşi probe de plasmă. Diferenţele dintre cele 6 probe paralele sînt de $\pm 5\%$.

După experimentarea metodei şi a materialului s-a trecut la utilizarea în laborator clinic a răşinii Ionenaustauscher Merck II, pregătită sub forma Cl^-, pentru determinarea indicelui de conversiune, după cum urmează :

Se recoltează 5 ml plasmă la 24 de ore după ingerarea dozei de 50 μC ^{131}I. Se măsoară activitatea totală a plasmei într-un vas tip. Plasma astfel măsurată se trece pe o microcoloană care conţine o cantitate de răşină calculată în funcţie de concentraţia anionilor din plasmă. Trecerea plasmei pe coloană se face cu un debit de 4 picături/min, apoi se spală cu 0,5 ml apă distilată. După reţinerea iodului mineral prin trecerea plasmei prin coloană, aceasta este remăsurată în aceleaşi condiţii stereometrice şi se calculează indicele de conversiune pe baza formulei :

$$I_c = \frac{\text{Imp./min proteine}}{\text{Imp./min plasmă}} \cdot 100$$

CONCLUZII

Determinarea indicelui de conversiune a iodului mineral în iod proteic legat se poate efectua în condiţii reproductibile nu numai cu ajutorul anioniţilor de tip bază foarte tare şi bază tare, ci şi cu anioniţi de tip bază slabă, în forma Cl^-, dat fiind faptul că la pH-ul sîngelui şi anioniţii de tip B.S. fixează iodul mineral ionic.

Avantajul folosirii anioniţilor de tipul bază slabă constă în faptul că ei au o capacitate de fixare (exprimată în miliechivalenţă/g răşină) dublă faţă de anioniţii de tipurile bază foarte tare şi tare, ceea ce permite o serie de îmbunătăţiri tehnice ale metodei.

Secţia de medicină nucleară,
I.M.F. Cluj

Prezentată la redacţie
la 20 octombrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Blanquet P., Meyniel G., Bernard C., Griffith-Belin J., Riolet M. H., J. Méd., Bordeaux, **8**, 242 (1961).
2. Clark D. E., Moe R. H., Adams E. E., Surgery, **26**, 331, şi Arch. intern. Med., 1951, **1**, 17 (1949).
3. Inczedy Janos, *Ioncselélök analitikai alkalmazása.* Budapesta, Müszaki Könyvkiado (1962).
4. King E. R., Mitchell T. G., *A Manual for Nuclear Medicine.* Ch. Thomas Publisher, Springfield, Illinois 14 (1961).
5. Meyniel G., Blanquet P., Mournier J., Estibotte M., Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, *2—3* 369 (1958).
6. Niculescu Zinca D., Niculescu Zinca E., *Contribuţiuni la determinarea iodului proteic radioactiv,* Simpozionul radioizotopi, Cluj, mai 1962.
7. Taranger J.M ., Milliery G., Crevat A., J. Méd. Bordeaux, **8**, 1095 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 89 – 96 (1965)

HIDROLIZA CU PAPAINĂ A γ_2 - GLOBULINELOR ŞI ANTICORPILOR FLUORESCENŢI DE IEPURE

CECILIA ŞELARIU, VICTOR GHEŢIE şi SILVIA MIHAESCU

576.8.0.97.5

Rezumat. — Hidroliza cu papainã a γ_2-globulinelor şi anticorpilor de iepure fluorocromaţi cu clorura acidului 1-dimetil-aminonaftalen-5-sulfonic a decurs în mod asemănător cu aceea a anticorpilor nefluorescenţi. Cromatografia pe CM-celuloză a hidrolizatului a indicat localizarea fluorocromului numai pe fragmentele I şi II. Electroforeza în gel de agaroză, folosită de autori, a condus la separarea satisfăcătoare a celor trei fragmente. Nu s-a constatat însă o concordanţă deplină între viteza de migrare electroforetică a acestor fragmente şi ordinea eluţiei lor de pe coloana de CM-celuloză.

O moleculă de γ_2-globulină, ca şi anticorpii asociaţi cu această fracţiune au fost scindaţi prin digestie cu papainã în trei fragmente, notate de R.R. Porter I. II. III [1], în ordinea eluţiei lor prin cromatografie pe CM-celuloză. Porter a presupus astfel că o moleculă de γ_2-globulină este formată din aceste trei fragmente.

Ulterior, J. Palmer şi colab. [2], P. Stelos şi colab. [3] şi M. Sela şi colab. [4], fiecare de altă cale, au ajuns la concluzia că asocierea fragmentelor I, II şi III în molecula γ_2-globulinelor de iepure se face în două feluri : I-I-III şi II-II-III, ceea ce arată că fragmentele I şi II separate din hidrolizat provin din molecule diferite. Acest punct de vedere este recunoscut şi de R. Porter într-o lucrare recentă [5].

Hidroliza enzimatică cu papainã a γ_2-globulinelor şi anticorpilor nu produce distrugerea configuraţiei iniţiale, ci doar desfacerea ei în fragmente ce corespund unei diviziuni naturale a moleculei originale [5]. Deci rezultatele obţinute prin studierea acestor fragmente pot fi generalizate şi raportate la molecula originală nativă.

Pe de altă parte, γ-globulinele şi anticorpii pot fi marcaţi prin combinare chimică cu coloranţi fluorescenţi, fără a li se modifica proprietăţile biologice şi imunologice. Pe această bază s-a dezvoltat metoda anticorpilor fluorescenţi, care permite localizarea în ţesuturi a celor mai diferite antigene şi anticorpi [6].

Anticorpii conţin diferite grupări chimice care pot fi interesate în fixarea fluorocromului. În afară de grupările aminice de la capătul fiecărui lanţ polipeptidic, mai pot lega fluorocromul şi grupările ε aminice

libere ale reziduurilor de lizină, precum şi cele de guanidă ale argininei, oxidril ale tirozinei şi imino ale histidinei şi triptofanului [6]. Datorită multiplelor posibilităţi de legare a fluorocromului cu molecula proteinelor, este greu, dacă nu chiar imposibil, de prevăzut cum vor fi distribuiţi fluorocromii în molecula anticorpilor. Singurul fapt sigur este că în majoritatea cazurilor fluorocromul nu se ataşează la locurile de combinare ale anticorpilor, deoarece aceştia nu-şi micşorează sensibil activitatea în urma fluorocromării.

În lumina datelor prezentate mai sus, ni s-a părut utilă efectuarea hidrolizei cu papaină a anticorpilor fluorescenţi şi urmărirea localizării fluorocromului în diferitele fragmente separate. Am folosit iepurii ca donatori de anticorpi, pentru a urmări distribuţia fluorocromului în ambele fragmente (I şi II) purtătoare ale activităţii de anticorp, deoarece celelalte specii nu au decît fragmentul I sau II. Ca fluorocrom am folosit fluorura acidului 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonic, din motive expuse pe larg într-o altă lucrare [7].

MATERIAL ŞI METODE

1. *Prepararea antiserurilor.* S-au imunizat iepurii cu γ-globulină umană purificată prin cromatografie pe DEAE-celuloză, după tehnica lui H. Levy şi H. Sober [8].

Schema de hiperimunizare s-a aplicat după tehnica recomandată de P. Grabar [9], administrînd animalelor antigenul în injecţii subcutanate, în amestec cu gel de hidroxid de aluminiu (Institutul Pasteur, Bucureşti). Antiserurile cu un titru mai mare de 1/10 000 au fost păstrate neamestecate, la frigider.

2. *Izolarea şi purificarea anticorpilor.* Un volum de antiser s-a diluat cu un volum egal de apă distilată şi s-a adăugat apoi o soluţie saturată, neutralizată, de sulfat de amoniu, pînă la realizarea unei concentraţii de 33%. Amestecul s-a lăsat în repaos 30 min şi s-a centrifugat apoi la 4 000 *g*, timp de 15 min. Operaţiile s-au efectuat la temperatura camerei. Precipitatul depus s-a dizolvat într-un volum minim de apă distilată, iar soluţia proteică a fost dializată 24 de ore faţă de o soluţie tampon fosfat pH 8,0, 0,02 M, cu schimbarea deasă a tamponului. În unele cazuri, precipitarea anticorpilor din antiser a fost realizată şi cu etanol la rece, după tehnica indicată de J.C. Nichol şi H. F. Deutsch [10].

Soluţia de γ_2-globulină brută a fost apoi trecută peste o coloană cromatografică de 1,7/17 cm, încărcată cu DEAE-celuloză şi echilibrată cu tampon fosfat pH 8,0, 0,02 M. S-au introdus între 50—100 mg de proteină. Eluţia s-a realizat cu tamponul de echilibrare, iar în fracţiunile colectate s-a determinat concentraţia proteică prin spectrofotometrare la 280 mμ. În aceste condiţii experimentale se eluează numai γ_2-globulina (globulinele 7S), celelalte impurităţi rămînînd fixate în coloană [11]. Fracţiunile colectate, care conţin proteină, s-au comasat şi apoi au fost liofilizate. Randamentul a fost în jur de 60% din γ-globulina totală a antiserurilor folosite.

Puritatea preparatului a fost verificată prin electroforeză în gel de agaroză (o singură fracţiune) şi prin imunoelectroforeză în acelaşi gel (o singură linie de precipitare). Anticorpii sînt de tipul 7S. Ei conţin şi cantităţi variabile din γ-globulinele neimune de acelaşi tip.

3. *Fluorocromarea anticorpilor* [7]. Preparatul de anticorpi s-a dizolvat în tampon Tris pH 8,0,0,05 M, pînă la o concentraţie proteică de 2 g%. Soluţia a fost dializată 24 de ore faţă de acelaşi tampon, pentru îndepărtarea ionului fosfat prezent în soluţia de anticorpi

liofilizată. S-a adăugat apoi clorură de 1-dimetilamino-naftalen-5-sulfonil, prinsă pe celită, în proporţie de 25 mg celită fluorescentă (2,5 mg fluorocrom) la 100 mg de proteină. Amestecul s-a agitat 30 de minute la temperatura camerei, apoi a fost centrifugat 10 min la 2 500 *g*. Supernatantul fluorescent a fost filtrat prin gel de Sephadex G-25, folosindu-se o coloană de 1,5/15 cm, iar eluţia s-a făcut cu o soluţie de clorură de sodiu 0,15 M. S-a colectat zona care se scurge prima din coloană şi care, examinată la UV, prezintă o fluorescenţă portocalie. Eluatul colectat a fost liofilizat.

4. *Hidroliza anticorpilor fluorescenţi* [12]. S-a preparat o soluţie de 1 g% din anticorpii fluorescenţi, în tampon acetat de sodiu-acid acetic pH 5,5, 0,1 M. S-a dializat faţă de acelaşi tampon, pînă la eliminarea clorurii de sodiu prezente în liofilizatul de anticorpi fluorescenţi. S-a adăugat apoi soluţiei, cisteină, şi EDTA, ca activatori, pînă la realizarea unei concentraţii de 0,001 M, respectiv 0,002 M. În sfîrşit, s-a adăugat papaină cristalizată (Difco), în proporţie de 1 mg/100 mg anticorpi fluorescenţi. Amestecul s-a incubat la 37°C timp de 16 ore. Hidroliza a fost oprită prin dializa soluţiei faţă de apă distilată, la rece [1]. Apa a fost schimbată cît mai des posibil. Dializa îndepărtează atît activatorii (cisteina şi EDTA), cît şi peptidele care pot rezulta din scindarea anticorpilor fluorescenţi [1]. Dializatul a fost liofilizat sau s-a concentrat prin pervaporare pînă la o concentraţie proteică care permite analiza prin cromatografie pe CM-celuloză sau electroforeză în gel de agaroză. Acţiunea specifică a papainei a fost controlată efectuînd o probă martor, fără papaină, care a fost prelucrată conform indicaţiilor de mai sus (inclusiv termostatare la 37°C, 16 ore).

5. *Electroforeza în gel de agaroză* [13]. Agaroza s-a obţinut după procedeul lui S. Hjerten [14]. S-a utilizat tamponul acetat pH 5,5. Concentraţia tamponului în cuvă a fost de 0,05 M, iar în plăci de 0,025 M. S-a folosit un gel de agaroză de 1,5 g% şi plăci de sticlă cu o lungime de 8 cm şi o lăţime variabilă, 2,5—6 cm. Potenţialul aplicat a fost de 10 V/cm, iar intensitatea curentului a variat între 0,7—0,8 mA/cm. Durata migrării n-a depăşit în mod obişnuit 3 ore. După efectuarea analizei, plăcile au fost examinate în UV şi s-au marcat zonele fluorescente. Fluorescenţa se păstrează şi după uscarea gelului. Plăcile au fost colorate cu amidoschwarz 10 B, deoarece produşii de hidroliză nu fixează decît slab albastrul de bromfenol.

6. *Probele de imunodifuzie.* Măsura în care preparatele de anticorpi îşi păstrează intactă capacitatea de a reacţiona cu antigenul s-a controlat după fiecare operaţie de purificare prin dublă difuzie (tehnica Ouchterlony) şi imunoelectroforeză. Imunoelectroforeza s-a efectuat după micrometoda Scheidegger [15], utilizînd tamponul veronal-veronal sodic de pH 8,6, cu o concentraţie de 0,05 M în cuvă şi 0,015 M în plăci. Gel de agaroză 1,5 g%, potenţial 15 V/cm, intensitate 0,8 mA/cm, durata migrării 90 minute. Antigenul (γ-globulină de om) s-a folosit în concentraţii variabile (1—5 g%).

7. *Cromatografia pe CM-celuloză.* Hidrolizatul enzimatic s-a dizolvat în tampon acetat pH 5,5, 0,01 M şi s-a dializat faţă de acelaşi tampon, 24 de ore, la rece. Concentraţia proteică a soluţiei a fost 1—2 g%. S-a introdus apoi într-o coloană cromatografică de 1/10 cm, umplută cu CM-celuloză şi echilibrată în prealabil cu tampon acetat de pH 5,5, 0,01 M. De obicei s-au introdus între 10—20 mg hidrolizat.

Eluţia s-a făcut cu tamponul de echilibrare pînă cînd s-a scos din coloană prima fracţiune proteică. Apoi s-a aplicat un gradient concav de concentraţie care, la sfîrşitul analizei, ajunge la 0,5 M tampon acetat pH 5,5. Creşterea gradientului s-a stabilit prin măsurarea conductibilităţii unora din fracţiunile colectate, în raport cu conductibilitatea tamponului acetat, pH 5,5 şi cu molaritate variabilă. S-au colectat fracţiuni de 2—3 ml. Ele au fost spectrofotometrate la 280 mμ (pentru proteină) şi la 315 mμ (pentru fluorocrom), la o grosime de strat de 1 cm.

Într-un caz s-a aplicat şi cromatografia pe CM-Sephadex C-50 (Pharmacia Uppsala), folosind condiţiile de eluţie indicate mai sus, cu deosebirea că s-au colectat fracţiuni de 5 ml şi coloana a avut dimensiuni mai mari (1,7/17 cm).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

S-a constatat că, în urma fluorocromării, anticorpii îşi păstrează capacitatea de a precipita specific antigenul corespunzător (γ-globulină umană). Anticorpii purificaţi şi fluorocromaţi dau aceeaşi imagine imunoelectroforetică şi de dublă difuzie ca şi antiserul folosit ca sursă pentru izolarea lor.

Hidroliza cu papaină a anticorpilor fluorescenţi a determinat însă, aşa cum era de aşteptat [1], pierderea capacităţii lor de a precipita specific antigenul corespondent. Analiza cromatografică pe CM-celuloză a hidrolizatului a evidenţiat prezenţa celor trei fracţiuni I, II şi III [1].

Faptul că anticorpii obţinuţi de la un singur animal se scindează în cele trei subunităţi arată că în serul animalelor individuale există atît anticorpi alcătuiţi din fragmentele I-I-III şi cît din fragmentele II-II-III. Această constatare este preţioasă, deoarece M. Sela şi colab. [4] au separat aceste două tipuri de γ_2-globulină (anticorpi) folosind antiseruri recoltate de la mai multe animale şi amestecate împreună. De aceea, aşa cum au subliniat şi autorii citaţi, era posibil ca eterogenitatea semnalată să fie cauzată de diferenţe alotipice dintre animale. Rezultatele noastre, obţinute pe anticorpi recoltaţi separat de la 5 animale, arată că cele două tipuri de anticorpi coexistă în sîngele fiecărui animal.

Proporţia fracţiunilor cromatografice I, II şi III a variat de la animal la animal, în limitele indicate de literatură [3], [16]. La două din animalele folosite s-a găsit un conţinut scăzut în fracţiunea II (fig. 1).

Această constatare nu este neobişnuită. Din lucrările lui M. Sela şi colab. [4] se desprinde concluzia că în serul iepurilor γ_2-globulina care conţine fragmentele II-II-III se găseşte într-o cantitate mult mai mică decît celălalt tip de γ_2- globulină (aproximativ 38%). La animalele la care am semnalat un conţinut scăzut în fracţiunea II, tipul de anticopi II-II-III se găseşte, probabil, în cantitate mult mai mică decît tipul I-I-III.

Prin cromatografie pe CM-Sephadex nu s-a obţinut o separare mai avansată sau o rezoluţie mai bună a hidrolizatului.

Cercetarea fluorescenţei fracţiunilor cromatografice a arătat că fluorocromul este fixat de fragmentele I şi II(fig. 1). Fragmentul III nu se fluorocromează într-o măsură sesizabilă prin tehnica folosită de noi.

Pentru a aprecia proporţia în care fragmentele I şi II leagă fluorocromul, s-a cercetat la fiecare din ele raportul $E^{1\ cm}_{315\ m\mu}/E^{1\ cm}_{280\ m\mu}$ pentru diferite concentraţii ale conjugatelor. Acest procedeu este corect în prima aproximaţie, deoarece cele două fragmente au aceeaşi greutate moleculară [17]. S-a constatat că raportul extincţiilor variază de la preparat la preparat. Astfel, pentru cazul prezentat în figura 1, la fragmentul I s-a calculat un raport de 0,19 — 0,22 în timp ce fragmentul II are un raport mai mare, 0,32 — 0,34 ceea ce pare a indica că acesta din urmă leagă o cantitate mai mare de fluorocrom. Această constatare nu este valabilă însă pentru alt

preparat, la care s-a constatat că fragmentele I și II leagă cantități aproximativ egale de fluorocrom, raportul extincțiilor oscilînd între 0,13 — 0,15.

Rezultatele noastre pot fi comparate cu cele obținute de P. Stelos și colab. [3] prin hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor marcate cu iod radioactiv (^{131}I). Ei au constatat că în molecula de γ-globulină neimună, fracțiunea I și II se iodurează în măsură egală, în timp ce în moleculele de anticorpi purificate specific, fracțiunea II se iodurează cu 25 — 30%

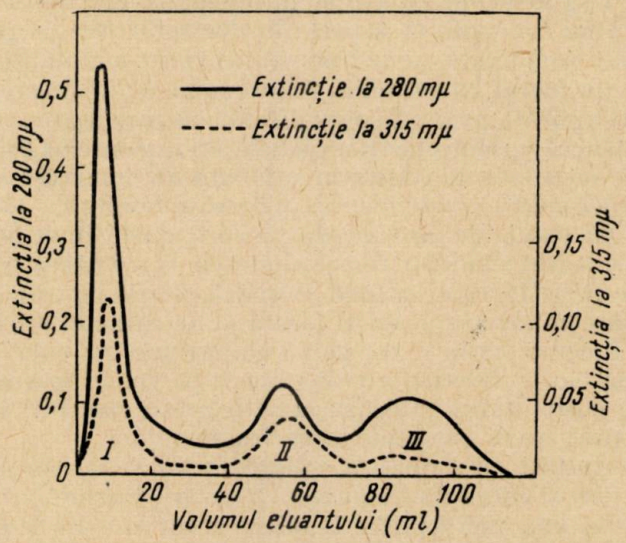


Fig. 1. — *Separarea cromatografică pe CM-celuloză a produșilor de hidroliză cu papaină a anticorpilor de iepure.* S-au introdus 15 mg hidrolizat ; coloană 1/10 cm ; eluția s-a făcut cu tampon acetat pH 5,5 în gradient de concentrație (0,01 M—0,5 M) ; s-au colectat fracțiuni de 3 ml.

mai puternic decît fracțiunea I. Deoarece noi am folosit preparate de anticorpi ce conțin cantități variabile de γ_2-globulină neimună, s-ar putea ca deosebirile semnalate înainte să fie determinate de această împrejurare. Desigur, zonele chimice de fixare a iodului și fluorocromului nu sînt identice, însă analogia făcută de noi poate fi totuși valabilă, cu condiția ca aceste zone reactive să aibă o distribuție similară în molecula de γ_2-globulină intactă.

La fel ca și la radioiodurare [3] prezența fragmentelor inegal fluorocromate indică proveniența lor din molecule diferite.

Distribuția fluorocromului în fragmentele I și II a fost urmărită și prin analiza electroforetică a hidrolizatului. Spre deosebire de tehnicile din literatură, care realizează separarea fragmentelor de γ_2-globulină nefluorocromată pe gel de amidon [13], noi am încercat eficiența gelului de agaroză, căruia lucrări precedente ale unuia din noi i-au demonstrat o înaltă capacitate de rezoluție electroforetică [13], [18]. Condițiile de electroforeză sînt cele folosite de F. Putnam și colab. [12] pentru gelul de amidon, cu deosebirea că în experiențele noastre durata migrării este conside-

rabil micşorată (de la 16 ore la 3 ore). Rezultatele sînt înfăţişate în figura 2. Se observă că şi în gelul de agaroză hidrolizatul papainic poate fi separat în cele trei fracţiuni. Expuse la lumina ultravioletă, plăcile prezintă fluorescenţă în zona fracţiunilor I şi II. În majoritatea cazurilor, fluorescenţa fracţiunii I a fost mai puternică.

Fracţiunea III are cea mai mare viteză de migrare electroforetică, fiind urmată de fracţiunile I şi II. Faptul că în experienţele noastre viteza de migrare a fragmentului II a fost întotdeauna mai mică decît viteza fragmentului I nu concordă cu separările electroforetice pe gel de amidon ale fragmentelor nemarcate, unde fragmentul II are o mobilitate mai mare. Deoarece noi am lucrat cu proteină fluorocromată, inversarea mobilităţilor ar putea fi explicată prin influenţa diferită pe care legarea fluorocromului o exercită asupra sarcinii electrice globale a fragmentelor I şi II. Această explicaţie este susţinută de constatarea făcută de numeroşi autori [6], că în urma fluorocromării, proteinele îşi măresc mobilitatea electroforetică. Totuşi, ea nu dă seama de neconcordanţa care există între ordinea eluţiei cromatografice a fragmentelor fluorescente (I, II) şi aceea a vitezelor lor electroforetice (I şi II), care, în mod obişnuit, se află într-un raport invers [19]. Această comportare poate fi legată şi de caracteristicile gelului de agaroză şi va fi cercetată în viitor pe un număr mai mare de probe.

Rezoluţia electroforetică satisfăcătoare pe gel de agaroză a fragmentelor deschide posibilitatea utilizării acestui gel în cercetări imunoelectroforetice care precizează antigenicitatea fragmentelor.

În conformitate cu structura γ-globulinelor şi anticorpilor susţinută de R. Porter (20) şi adoptată de numeroşi autori, fragmentul I sau II este alcătuit dintr-un lanţ polipeptidic B intact şi un rest din lanţul A. Deoarece, la iepure, capătul N-terminal al lanţului A cuprins în fragmentul I sau II este blocat, fluorocromul se poate lega numai de aminoacizii N-terminali ce se găsesc în lanţul B. Dacă numai aceste grupări leagă fluorocromul, pare posibil că acesta să fie fixat în lanţul polipeptidic B al moleculei intacte.

Condiţiile de fluorocromare aplicate de noi permit introducerea a aproximativ patru molecule de fluorocrom într-o moleculă de anticorp [21]. Deoarece o moleculă conţine două fragmente I sau II care monopolizează întreaga cantitate de fluorocrom, înseamnă că într-un fragment se fixează aproximativ două molecule de fluorocrom. Dacă una din ele este legată de aminoacizii N-terminali ai lanţului polipeptidic B, înseamnă că cealaltă moleculă poate fi asociată de un rest ε-aminic de lizină fie al lanţului A, fie al lanţului B. Cantitatea mai mare de lizină din lanţul A faţă de lanţul B (23 moli faţă de numai 8 moli) [20] măreşte probabilitatea ca lanţul A să lege şi el o moleculă de fluorocrom.

Nefluorocromarea fragmentului III alcătuit din două resturi din lanţul A se poate explica atît prin „mascarea" grupărilor ε-aminice de pe catena polipeptidică a acestui fragment cît şi prin blocarea capătului C-terminal de către glucidele asociate de molecula de γ_2- globulină intactă.

Din cele prezentate se detaşează concluzia că fluorocromul nu se fixează uniform pe întreaga moleculă de anticorpi, ci este legat selectiv în regiunea corespunzătoare fragmentelor papainice I sau II.

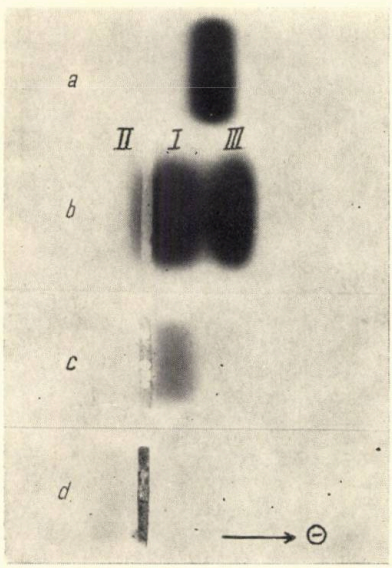


Fig. 2. — *Electroforeza pe gel de agaroză a anticorpilor și a fragmentelor obținute prin hidroliza lor cu papaină.*
Tampon acetat pH 5,5, 0,05 M în cuvă, 0,025 M în plăci ; potențialul 10 V/cm, intensitatea 0,7 mA/cm, durata 3 ore.
a — anticorpi intacți ;
b — hidrolizat total (fracțiunile III, I, II) ;
c — fracțiunea cromatografică I ;
d — fracțiunea cromatografică II.

CONCLUZII

1. Prin fluorocromare anticorpii își păstrează capacitatea de a fi hidrolizați cu papaină. Hidroliza lor decurge asemănător aceleia a anticorpilor nefluorescenți.

2. Fluorocromul se localizează numai pe fragmentele I și II. Fragmentul III nu se fluorocromează.

3. La fragmentele I și II fluorocromul este legat probabil de grupările N-terminale ale lanțului polipeptidic B.

4. Fragmentul III nu leagă o cantitate semnificativă de fluorocrom datorită absenței grupărilor chimice reactive de pe lanțul polipeptidic A.

5. Hidrolizatul poate fi separat satisfăcător în cele trei fragmente prin electroforeză în gel de agaroză. Nu există o concordanță deplină între viteza de migrare electroforetică a acestor fracțiuni și ordinea eluției lor de pe coloana de CM-celuloză.

6. În serul fiecărui iepure cercetat (imunizat sau neimunizat) s-au evidențiat atît γ_2-globulinele I-I-III cît și cele II-II-III.

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.

Prezentată la redacție
la 28 octombrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. R. R. Porter, *The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain*, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
2. J. L. Palmer, W. J. Mandy, A. Nisonoff, *Heterogeneity of rabbit antibody and its subunits*, Proc. nat. Acad. Sci., **48**, 49 (1962).
3. P. Stelos, G. Radzimski, O. Pressman, *Heterogeneity of rabbit antibody fragments*, J. Immunol., **88**, 572 (1962).
4. M. Sela ,D. Givol, E. Mozes, *Resolution of rabbit γ-globulin into two fractions by chromatography on diethylaminoethyl-Sephadex*, Biochim. biophys. Acta, **78**, 649 (1963).
5. R. R. Porter, *The structure of γ-globulin and antibodies*, în A. Gelhorn a. E. Hirschberg, *Basic problems in neoplastic disease*, Columbia Univ. Press., New York- Londra, 1962, p. 177.
6. R. C. Nairn, *Fluorescent protein tracing*, Livingstone, Edinburgh — Londra, 1962.
7. H. D. Schell, V. Gheție, *Die Fluoreszenszmarkierung der Serumeiweisstoffe mit l-dimethyl-amino-naphtalin-5-sulfonsäurechlorid und Reinigung der erhaltenen Konjugate*, Rev. roum. Biochim., **1**, 203 (1964).
8. H. B. Levy, H. A. Sober, *A simple chromatographic method for preparation of gamma-globulin*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **103**, 250 (1960).
9. P. Grabar, J. Courcon, *Etude des sérums de cheval, lapin, rat et souris par l'analyse immunoélectrophorétique*, Bull. Soc. Chim. biol., **40**, 1993 (1958).
10. J. C. Nichol, H. F. Deutsch, *Biophysical studies of blood plasma proteins. VII. Separation of γ-globulin from the sera of various animals*, J. amer chem. Soc., **70**, 80 (1948).
11. J. L. Fahey, A. P. Horbett, *Human gamma-globulin fractionation on anion exchange cellulose columns*, J. biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
12. F. W. Putnam, M. Tan, L. T. Lynn, C. W. Easley, S. Migita, *The cleevage of rabbit γ-globulin by papain*, J. biol. Chem., **237**, 717 (1962).
13. V. Gheție, D. Moțet-Grigoraș, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, St. cerc. biochim., **5**, 409 (1962).

14. S. HJERTÉN, *Agarose as an anticonvection agent în zone electrophoresis*, Biochim. biophys. Acta, **53**, 514 (1961).
15. J. J. SCHEIDEGGER, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
16. P. STELOS, O. ROHOLT, P. PRESSMAN, *Heterogeneity of the major fractions of papain digests of rabbit antibody*, J. Immunol., **89**, 113 (1962).
17. P. A. CHARLWOOD, *Ultracentrifugal examination of digestion products from rabbit γ-globulin*, Biochem. J., **73**, 126 (1959).
18. D. MOŢET, V. GHEŢIE, *Preparative electrophoresis in agarose gel*, Rev. roum. Biochim., **1**, 175 (1964).
19. E. A. PETERSON, H. A. SOBER, *Column chromatography of proteins: substituted celulloses*, în S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Academie Press, New York, 1962, vol. V, p. 3.
20. R. R. PORTER, *Chemical structure of γ-globulin and antibodies*, Brit. Med. Bull., **19**, 197 (1963).
21. P. ALBRECHT, F. SOKOL, *Fluorescent antibody method. Optimal conditions for conjugation of l-dimethyl-aminonaphtalene-5-sulphonyl chloride with γ-globulin*, Folia microbiol., **6**, 49 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 97–107 (1965)

DETERMINAREA UNOR ACTIVITĂŢI ENZIMATICE CA METODĂ DE CERCETARE A NĂMOLULUI ACTIV *

L. VAICUM, E. GRUIA şi S. GODEANU

628.356

Rezumat. — Buna exploatare a instalaţiilor de epurare biologică cere metode de informare rapidă asupra stadiului de funcţionare a nămolului activ. Pornind de la faptul că eficienţa de epurare biologică este controlată de factorii care acţionează asupra activităţii metabolice a nămolului activ sau asupra peliculei biologice, se încearcă introducerea metodelor enzimatice ca metode de cercetare a nămolului activ.

În acest scop, s-au corelat valorile activităţilor catalazice, dehidrazice şi ureazice cu valorile altor indicatori fizico-chimici uzuali: consumul chimic şi biochimic de oxigen, conţinutul de impurificator principal — glucoză, substanţe petroliere, — potenţial de oxidoreducere, şi cu examenul microscopic al nămolului activ.

Cercetările s-au efectuat pe nămol activ alimentat cu soluţii de glucoză şi uree, ca şi pe nămol activ rezultat de la epurarea biologică a apelor reziduale de la o rafinărie de petrol. Ele au arătat că activităţile enzimelor cercetate urmăresc îndeaproape variaţiile celorlalţi indicatori fizico-chimici şi că există o bună corelaţie între variaţiile activităţilor enzimatice şi aspectul biologic al nămolului. Încercările de intoxicare a nămolurilor cu KCN şi $HgCl_2$ nu au inhibat activitatea nămolului la concentraţiile adăugate.

Concluzia cercetării este că determinările activităţilor enzimatice pot fi instrumente de lucru precise şi sensibile pentru studierea nămolului activ şi care pot da informări mai rapide decît ceilalţi indicatori asupra stării de funcţionare la un moment dat a instalaţiei de epurare biologică.

În epurarea apelor menajere şi a unei mari părţi din apele reziduale industriale, îndepărtarea impurificării organice se face mai ales prin metode biologice, şi anume prin biooxidarea produsă de organismele care formează pelicula biofiltrelor sau flocoanele nămolului activ din aerotancuri.

La baza ambelor sisteme de epurare biologică stau principiile autoepurării aerobe naturale; deosebirea constă în intensitatea proceselor şi ea se datoreşte în principal densităţii foarte mari a microorganismelor, care găsesc condiţii favorabile de viaţă datorită aportului suplimentar de oxigen şi suprafeţelor mari pe care au loc procesele fizice şi chimice.

*Lucrare publicată în Rev. roum. Bochim., 2, 1 (1965), în limba engleză.

În biofiltre, ca și în aerotancuri, se petrec aceleași fenomene, totuși posibilitatea de dirijare a cercetărilor în sensul dorit de noi se face cu mai multă ușurință cu ajutorul nămolului activ, astfel că majoritatea informațiilor obținute asupra mecanismului intim de epurare se datoresc acestuia.

Nămolul activ constă din microorganisme în diferite faze de creștere, materie organică oxidabilă și neoxidabilă și solide neorganice, deci din elemente celulare, constituenți minerali și materie organică amorfă [4].

Procesul de epurare biologică a apelor reziduale se bazează pe adsorbția coloizilor și a suspensiilor din apă pe suprafețele flocoanelor și pe difuzia substanțelor dizolvate prin membrana celulară a microorganismelor, în vederea asimilării.

Eficiența de epurare a unei instalații de nămol activ este funcție de factorii care acționează asupra formării nămolului și asupra activității metabolice a acestuia. Factorii implicați pot fi de natură fizică (posibilitatea de dispersare a oxigenului în apa reziduală, mișcarea particulelor în suspensia de nămol, calitățile coloid-fizice ale apei de alimentare), chimică (natura organică și concentrația substanțelor reziduale, existența toxicelor) etc. Influențele sînt multiple și unele dintre ele cu acțiune rapidă asupra capacității de epurare biologică.

Exploatarea optimă a instalațiilor cere stăpînirea unor metode adecvate de urmărire a nămolului activ pentru a putea interveni din timp în cazul scăderii eficienței de funcționare.

Caracterizarea microscopică a nămolului activ dă o indicație bună asupra funcționării normale a unei instalații cunoscute, însă deoarece în cele mai multe cazuri schimbarea morfologiei nămolului activ se petrece într-un timp relativ îndelungat, examinarea microscopică nu poate furniza întotdeauna date imediate asupra schimbărilor petrecute.

Caracterizarea fizico-chimică, și anume determinarea reducerii substanțelor organice exprimate prin consumul chimic de oxigen (CCO) și prin consumul biochimic de oxigen la 5 zile (CBO_5), ca și indicele de nămol, dă posibilitatea urmăririi eficienței de tratare a apelor reziduale în același mod ca și cercetarea microscopică. Rezultatele obținute pot fi indicatori foarte buni, nu însă întotdeauna suficient de rapizi și de reali. Astfel determinarea CBO_5 prin metoda diluției, prin însuși mersul ei, dă indicații tardive, iar de multe ori valorile mici nu înseamnă o bună funcționare a stației ci, dimpotrivă, o inhibare a microorganismelor. În mod analog și valorile obținute în reducerea procentuală a CCO pot uneori denatura interpretarea, în sensul că valori mici nu înseamnă întotdeauna eficiență de epurare biologică mică.

Constatarea că epurarea apelor reziduale este funcție de metabolizarea substratului organic, deci de oxidarea lui în interiorul celulei microorganismelor a dus la căutarea unor metode de caracterizare a nămolului bazate pe proprietățile lui de respirație. Pe această linie se situează încercările introducerii în practică a determinării consumului biochimic de oxigen imediat cu metode micromanometrice, de exemplu cu respirometrul Warburg, ca și determinarea potențialului de oxidoreducere (redox) a nămolului dat. Rezultatele obținute sînt promițătoare și cercetări mai numeroase vor da valori de introdus în practică. Respirația celulară, ca

și metabolizarea oricărui substrat organic, este catalizată de sistemele enzimatice prezente sau induse în celulă. Orice activizare sau inhibare a acestor catalizatori se reflectă în proprietățile de consumare a substanțelor organice din apa reziduală, deci orice variație suferită de nămolul activ (posibilități de aerare, șocuri de ape reziduale toxice, antagonisme biologice, adaptarea la diferite substrate etc.) se traduce în activitatea enzimelor respective. În cele mai multe cazuri, concentrațiile enzimelor se determină cu destulă ușurință, de aceea în ultimii ani atenția cercetătorilor s-a îndreptat spre metodele enzimatice de verificare rapidă a eficienței de epurare a nămolului activ. Datorită noutății problemei și caracterului mai specific, cercetările în acest domeniu sînt puține și încă nu sînt sistematice. Se menționează determinarea următoarelor activități enzimatice în nămol activ : proteaze [7] [8], ureaza [7], o serie de enzime ale sistemului respirator — catalază [10], peroxidază [5] [10], coenzimă Q [12], dehidraze [2].

Dintre acestea catalaza și dehidraza au dus la caracterizarea apelor reziduale în ceea ce privește toxicitatea lor față de nămolul activ [1], [2], [10].

Variația enzimatică a nămolului activ sub acțiunea diferiților factori în vederea caracterizării lui, a fost abordată în literatură [2] [5]; sînt însă necesare studii mai amănunțite.

Pentru a stabili posibilitatea introducerii determinărilor enzimatice ca metode noi de informare rapidă și exactă a eficienței nămolului activ, trebuie efectuată corelarea activității enzimatice cu alți indicatori fizico-chimici și biologici uzuali în epurarea apelor.

În acest scop am cercetat catalaza și dehidraza ca enzime ale sistemului respirator celular, deci cu cea mai largă răspîndire în microorganisme, și ureaza ca enzimă specifică, răspunzătoare de fermentarea amoniacală a urinii.

Catalaza catalizează descompunerea apei oxigenate formată în procesul oxidărilor celulare. Pe această proprietate se bazează și măsurarea activității ei prin dozarea iodometrică a apei oxigenate nedescompuse la anumite intervale de timpi. După metoda lui Sumner și Dounce [3] activitatea s-a exprimat în unități de catalază pe gram de nămol umed.

Dehidrazele (sau reductazele) intervin tot în lanțul de oxidare-reducere din celulă, catalizînd transferul atomilor de hidrogen spre un acceptor care poate fi oxigenul sau nu, după potențialul redox al sistemului. Pentru dozarea activității enzimatice s-a întrebuințat proprietatea sărurilor de tetrazoliu (clorură de trifenil tetrazoliu) de a accepta hidrogen, trecînd în formazan colorat roz-violet. Bucksteg și Thiele [2] folosesc această metodă pentru determinarea activității dehidrazice a nămolului menajer.

Ureaza catalizează hidroliza ureei în amoniac și bioxid de carbon și este răspunzătoare de fermentarea amoniacală a urinei. Activitatea ureazică s-a determinat prin dozarea ionilor de amoniu obținuți la hidroliză și se exprimă în miligrame de azot eliberat dintr-o cantitate determinată de substrat [3].

Pentru efectuarea cercetărilor s-au preparat nămoluri active din soluții cunoscute, și anume :

— nămol activ obținut prin însămînțarea cu nămol menajer a soluției apoase de 1 000 mg/l glucoză, la care s-au adăugat sulfat de amoniu și fosfat de potasiu ca substanțe hrănitoare în raportul CCO/N = 20/1, CCO/P = 100/1 [9];

— nămol activ obţinut prin însămînţarea cu nămol menajer a soluţiei apoase de 850 mg/l glucoză şi 60 mg/l uree. Deoarece azotul necesar microorganismelor se obţine din uree, s-a adăugat numai fosfat de potasiu în raportul stabilit.

Sistemul de alimentare a nămolului activ format cu soluţiile corespunzătoare este discontinuu, adică apa de alimentare introdusă în instalaţie se aerează 23 de ore, se lasă să decanteze o oră şi se evacuează supernatantul pentru a se putea introduce noua apă de alimentare [9].

Concomitent cu dozările activităţilor enzimatice, s-au efectuat următoarele determinări :

În fază apoasă : consumul chimic de oxigen (CCO) la alimentare şi evacuare
consumul biochimic de oxigen la 5 zile (CBO_5) la alimentare şi evacuare
conţinutul de glucoză la alimentare şi evacuare
pH la evacuare

În faza solidă : potenţialul de oxidoreducere
activitatea catalazică
activitatea dehidrazică
activitatea ureazică (numai la nămol alimentat cu uree)
examen microscopic.

Lucrările lui Liubimov şi Kogan [7] dovedind că enzimele sus-menţionate nu se găsesc în faza apoasă, ci sînt adsorbite pe floculii nămolului activ, mărindu-le activitatea fermentativă, preparatele enzimatice brute s-au obţinut din aceeaşi cantitate de nămol activ centrifugat timp de 5 min la 2000 de ture /min şi triturat cu nisip de cuarţ, în prezenţa tamponului fosfat la pH 7.

După o funcţionare normală timp de mai multe săptămîni, sistemele de nămol activ au următorii indici medii săptămînali :

Nămolul format pe glucoză (tabela nr. 1) :

Tabela nr. 1

Determinări fizico-chimice şi enzimatice efectuate la evacuare asupra sistemului nămol activ-apă obţinut prin alimentarea cu soluţie de glucoză
Caracteristicile apei de alimentare:
CCO = 1 000 mgO_2/l
CBO_5 = 800 mgO_2/l
Glucoză = 1 000 mg/l
Sulfat de amoniu = 50mg/l N_2
Fosfat monopotasic = 10mg/l P

Nr. probei săptămînale	Consum chimic de oxigen (CCO) mgO_2/l	Consum biochimic de oxigen la 5 zile (CBO_5) mgO_2/l	Glucoză mg/l	pH	Potenţial redox mV	Dehidrază diviziuni colorimetru	Catalază unităţi/g nămol umed
1	145	32	0,90	5,00	387	—	0,130
2	86	38	2,26	5,70	397	31	0,170
3	60	1	—	6,50	372	—	0,160
4	89	—	0,25	6,65	387	34	—
5	59	—	0,40	6,75	389	32	0,168
6	99	25	0,28	—	—	33	—
7	98	25	1,00	6,75	400	30	0,184
8	127	—	1,00	6,75	—	30	—
9	78	14	0,95	—	412	31	0,140
10	98	21	1,40	—	—	31	0,180

Reducerea CCO este de aproximativ 90% (80 — 94%); rămîne în sistem substanţă organică corespunzătoare unui CCO de 93,9 mg O_2/l.

Reducerea CBO_5 este de aproximativ 97% (90 — 99%); rămîne în sistem substanţă organică corespunzătoare unui CBO_5 de 22 mgO_2/l.

Consumul de glucoză este de 99,7% (99,4 — 99,9%);] în sistem rămîne 0,2 — 2 mg/l glucoză, în medie 0,94 mg glucoză/l.

pH = 5 — 6,7 (fermentare cu tendinţă acidă).

Potenţialul redox variază între + 320 şi + 420 mV, în medie + 392 (normal pentru fermentarea aerobă a nămolurilor active).

Activitatea dehidrazică s-a menţinut tot timpul constantă, în medie 32 de diviziuni (30 — 35) ale extinctiometrului Orion la λ = 480 m.

Activitatea catalazică este mai puţin constantă (0,130 — 0,182), dînd o medie de 0,162 de unităţi pe gram de nămol umed.

Dinamica dezvoltării organismelor în această perioadă este următoarea : se formează flocoane mari, din diverse tipuri de bacterii, populate de cîteva specii de ciliate libere, dominant fiind *Paramaecium caudatum*. Apare sulfobacteria *Beggiatoa*, care se întîlneşte în cantitate mare. Urmează apoi dominarea bacteriilor stafilococice. În acest timp, dintre ciliate o mare dezvoltare o are *Glaucoma pyriformis*, care este apoi înlocuită de *Colpidium colpoda*. Ulterior încep să se dezvolte tot mai abundent ciupercile, care transformă flocoanele în nişte îngrămădiri de hife, printre care se întîlnesc în exemplare izolate vorticele şi parameci (fig. 1).

Nămolul format pe uree (tabela nr. 2):

Tabela nr. 2

Determinări fizico-chimice şi enzimatice efectuate la evacuarea asupra sistemului nămol activ-apă obţinut prin alimentare cu soluţie de glucoză şi uree.
Caracteristicile apei de alimentare:

CCO = 850 mgO_2/l
CBO_5 = 700 mgO_2/l
Glucoză = 850 mg/l
Uree = 60 mg/l
Fosfat monopotasic = 8 mg/l P

Nr. probei săptămînale	Consum chimic de oxigen CCO mgO_2/l	Consum biochimic de oxigen la 5 zile (CBC_5) mgO_2/l	Gulcoză mg/l	pH	Potenţial redox mV	Dehidrază diviziuni colorimetrice	Catalază unităţi/g nămol umed	Urează mg N_2/100 g nămol umed
1	73	—	0,40	6,50	397	—	0,200	—
2	129	10	0,66	6,90	452	—	0,168	—
3	80	3	—	—	—	—	0,213	—
4	78	30,5	—	6,60	212	—	—	—
5	67	—	2,00	—	—	61	0,196	96,2
6	40	—	0,70	7,10	352	63	0,135	120
7	30	—	3,20	7,05	357	60	0,216	65
8	111	—	0,54	6,25	217	62	—	130
9	74	14	0,60	6,50	222	60	0,203	86
10	59	32	1,20	—	—	65	—	200
11	78	26	2,75	—	—	61	0,188	71

Reducerea CCO este de aproximativ 90% (80—95%); rămîne în sisteme substanță organică corespunzătoare unui CCO de 83,5 mgO_2/l.

Reducerea CBO_5 este de aproximativ 97,5% (91—99%); rămîne în sistem substanță organică corespunzătoare unui CBO_5 de 20 mgO_2/l.

Consumul de glucoză este de aproximativ 99,7% (99,2—99,9%), în sistem rămîn 0,4—3,2 mg/l glucoză (în medie 1,34 mg/l glucoză).

pH = 6,5—7,3.

Potențialul de oxidoreducere variază de la + 200 la +450 mV (în medie +315 mV).

Activitatea dehidrazică este dublă față de nămolul de la glucoză, în medie 62 de diviziuni (60—65) colorimetrice.

Activitatea ureazică este în medie de 112,7 mg N/100 nămol umed (65—200 mg N).

Activitatea catalazică are valori medii de 0,190 de unități pe g de nămol umed (0,134—0,204).

Ca aspect biologic, se observă la început dezvoltarea bacteriilor stafilococice și a ciliatului *Paramaecium caudatum*. Ulterior a apărut și s-a dezvoltat sulfobacteria *Beggiatoa alba*, rotiferul *Lecane* sp., vorticelele (3—4 specii diferite) și ciupercile. Printre aceste flocoane bacteriene circulă *Paramaecium*, rotifere, rare flagelate (*Peranema*, *Entosyphon*) (fig. 2).

Pentru urmărirea corelației activităților enzimatice cu ceilalți indicatori uzuali ai verificării funcționării nămolului activ prin modificarea condițiilor normale, nămolul activ inițial s-a împărțit în mai multe compartimente și, după perioada de adaptare, s-a trecut la intoxicarea lui cu inhibitori specifici catalazei (KCN) și dehidrazei, ca și ai ureazei (Hg^{++}).

Într-o primă perioadă s-au adăugat cantități mici de inhibitori, suficiente după literatură pentru ca să inhibe *in vitro* sistemele catalazice menționate, și anume 0,065 mg/l KCN și 2,3 mg/l $HgCl_2$ [3].

Tabelele nr. 3 și 4 prezintă variația indicatorilor fizico-chimici cercetați (potențial redox, CCO, CBO_5, cantitățile rămase de glucoză în sistem) față de variația activității enzimelor cercetate.

Pentru sistemul nămol activ-glucoză la care intoxicarea s-a efectuat cu cianură și cu sarea de mercur, cantitățile introduse nu au avut un efect inhibitor, valorile obținute pentru indicii de funcționare ai nămolurilor supuse intoxicării fiind de același ordin de mărime ca cele pentru nămolul martor.

Se remarcă însă valori mai scăzute ale activității catalazice a nămolului intoxicat.

În cazul sistemului nămol activ-uree, diferențele dintre martor și nămolul activ intoxicat sînt neînsemnate pentru indicii clasici; la activitățile enzimatice cercetate se constată o deosebire mai accentuată între nămolul martor și cel intoxicat, mai ales în primele zile de la tratarea cu toxice.

Influența scăzută a cantităților mici de toxic se poate explica prin adaptarea cunoscută a microorganismelor la cianura de potasiu — pînă la cantități de 100 mg/l [6] — și prin reducerea influenței ionilor de

Tabela nr. 3

Caracteristicile fizico-chimice și enzimatice ale sistemului nămol activ-apă alimentat cu glucoză, tratat și netratat cu cantități variabile de KCN și $HgCl_2$

Nr. probei săptămînale	Consum chimic de oxigen (CCO)	Consum biochimic de oxigen la 5 zile (CBO_5) mg O_2/l	Glucoză mg/l	pH	Potențial redox mV	Dehidrază diviziuni ale colorimetrului	Catalază unități/g nămol umed	Observații
1a	—	5	2,10	—	—	34	—	a = martor
b	—	0,5	2,45	—	—	40	—	b = tratat cu 0,065 mg/l KCN
c	40	0,5	2,65	—	—	42	—	c = tratat cu 2,3 mg/l $HgCl_2$
2a	—	47	0,50	5,70	429	35	0,227	
b	—	123	0,50	6,30	407	41	0,206	
c	—	20	0,50	6,05	402	50	0,145	
3a	120	10	1,25	—	407	35	0,266	
b	140	30	1,50	—	447	42	0,131	
c	160	45	2,80	—	287	40	0,184	
4a	106	21,4	0,30	—	—	—	0,168	
b	101	7,2	0,40	—	—	—	0,079	
c	77	0,2	0,20	—	—	—	0,101	
5a	230	—	0,75	6,30	407	26	0,368	
b	58	—	0,45	6,30	422	30	0,145	
c	115	—	0,70	6,35	432	25	0,237	
6a	125	34	1,50	—	—	27	0,123	
b	93	44	1,60	—	—	15	0,079	
c	98	22	1,00	—	—	24	0,146	
7a	251	4,0	1,25	5,35	277	42	0,346	
b	195	8,0	1,50	4,60	262	27	0,189	
c	250	6,1	1,15	5,00	272	30	0,050	
8a	381	10,2	1,65	5,95	222	47	0,187	S-a mărit doza de toxic la 1,5 mg/l CN^- și 10 mg/l Hg^{++}
b	149	6,8	2,35	5,80	217	25	0,131	
c	93	1,2	1,75	5,95	247	20	0,081	
9a	120	31,5	1,55	—	—	59	—	
b	190	13,0	2,40	—	—	36	—	
c	110	36,4	2,25	—	—	37	—	
10a	0	—	—	7,40	197	—	—	
b	10	—	—	6,65	170	—	—	
c	16	—	—	6,57	205	—	—	
11a	190	16,4	2,50	6,70	97	—	0,048	
b	220	34	2,30	7,10	137	—	0,026	
c	140	16,8	2,15	—	177	—	0,040	
12a	89	14,2	1,60	6,75	137	56	0,102	
b	79	7,0	2,65	6,20	237	44	0,041	
c	99	3,2	2,40	6,10	192	41	—	

Tabela nr. 4

Caracteristicile fizico-chimice şi enzimatice ale sistemului nămol activ-apă alimentat cu glucoză şi uree, tratat şi netratat cu cantităţi variabile de $HgCl_2$

Nr. probei săptămînale	Consum chimic de oxigen (CCO) mgO_2/l	Consum biochimic de oxigen la 5 zile (CBO_5) mgO_2/l	Glucoză mg/l	pH	Potenţial redox mV	Dehidrază diviziuni colorimetrice	Catalază unităţi /g nămol umed	Uree mgN_2/ 100 g nămol umed	Obs.
1a	100	0,5	0,95	—	—	61	—	170	a = martor
b	100	0,5	0,96	—	—	44	—	100	b = tratat cu 2,3 mg/l $HgCl_2$
2a	—	—	0,45	6,65	442	60	0,060	170	
b	—	—	1,05	6,40	402	41	0,024	38	
3a	—	—	0,50	—	197	63	0,033	140	
b	—	—	1,75	—	172	48	0,032	80	
4a	77	4,6	—	—	—	—	0,213	—	
b	67	2,4	—	—	—	—	0,125	—	
5a	38	16,4	0,90	7,5	417	60	0,200	149	
b	48	1,2	0,80	7,5	417	66	0,152	149	
6a	—	—	—	—	—	—	0,135	—	
b	—	—	—	—	—	—	0,166	—	
7a	205	12,3	0,65	7,65	297	28	0,216	149	
b	130	4,6	0,80	7,70	273	25	0,188	134	
8a	75	6,8	1,70	6,40	177	15	0,203	122	S-a mărit doza de $HgCl_2$ la 10 mg/l Hg^{++}
b	—	5,8	2,00	6,40	197	13	0,208	178	
9a	30	—	1,72	—	—	20	—	164	
b	74	—	2,05	—	—	12	—	149	
10a	140	58	0,95	6,75	107	16	0,030	185	
b	20	8,0	2,00	7,48	127	15	0,018	167	
11a	120	14,0	0,70	7,36	177	—	0,100	252	
b	160	32,0	0,70	6,90	122	—	0,080	238	
12a	50	4,0	0,80	—	—	16	0,092	203	
b	50	6,0	1,80	—	—	24	0,061	73	

mercur datorită reacţiei dintre aceştia şi urmele de H_2S degajat în timpul fermentării acide, după cum arată şi înnegrirea nămolului.

În această perioadă, de asemenea din punct de vedere biologic nu se poate vorbi de vreo influenţă negativă a toxicelor asupra microorganismelor din sistemul nămol activ-glucoză. Flocoanele de bacterii stafilococice se dezvoltă bine, ciupercile regresează, vorticelele şi operculariile se dezvoltă (chiar mai bine în instalaţiile intoxicate).

În sistemul nămol activ-uree situaţia este asemănătoare :

Se dezvoltă abundent diverse organisme (apare şi ciliatul *Aspidisca*), se înmulţesc flagelatele şi rotiferele.

După cîteva săptămîni de funcţionare a instalaţiilor intoxicate în condiţiile date, s-a mărit doza toxicelor la 1,5 mg CN^-/l şi 10 mg Hg^{++}/l.

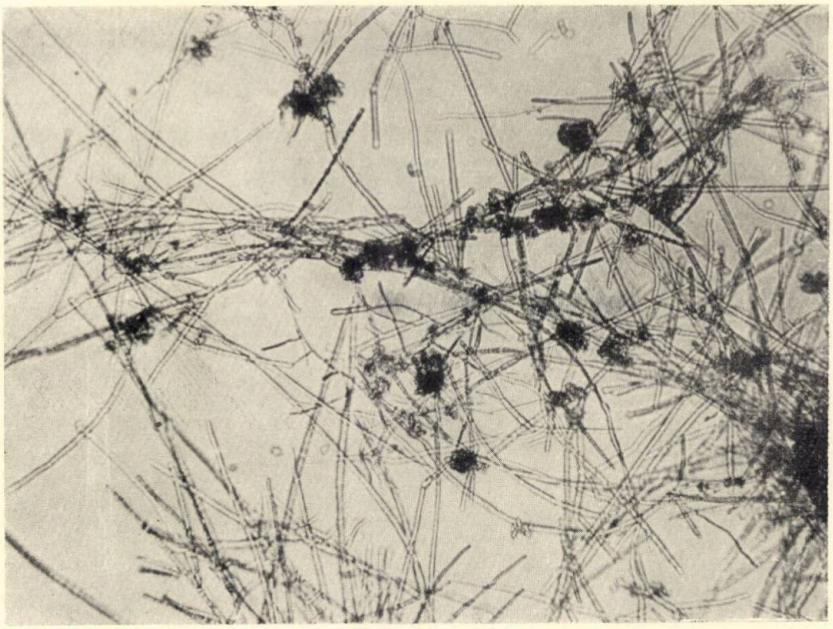


Fig. 1. — Aspectul nămolului activ alimentat cu soluţie de glucoză.

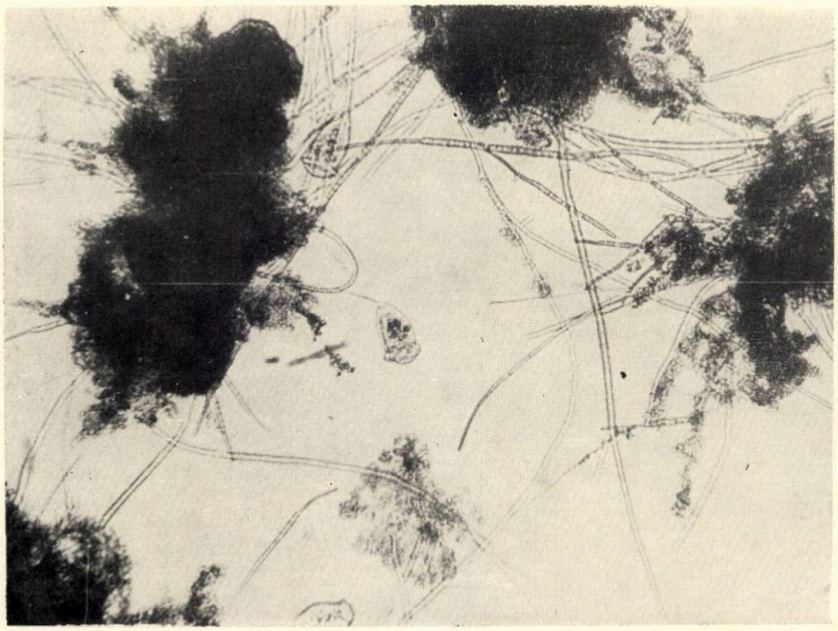


Fig. 2. — Aspectul nămolului activ alimentat cu soluţie de uree.

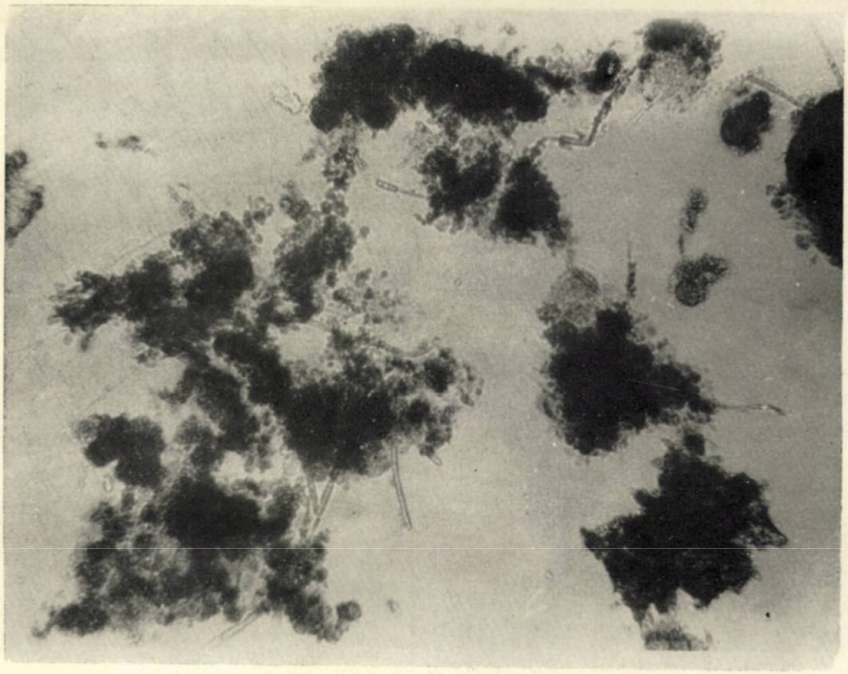


Fig. 3. — Aspectul nămolului activ alimentat cu soluție de uree, intoxicat cu $HgCl_2$, la sfîrșitul experienței.

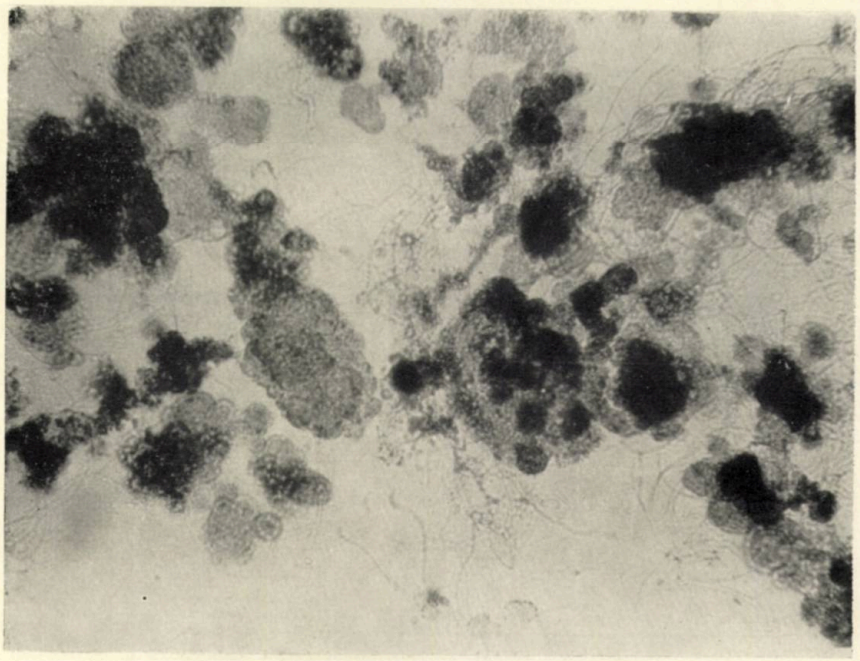


Fig 4. — Aspectul nămolului activ alimentat cu soluție de uree, neintoxicat, la sfîrșitul experienței.

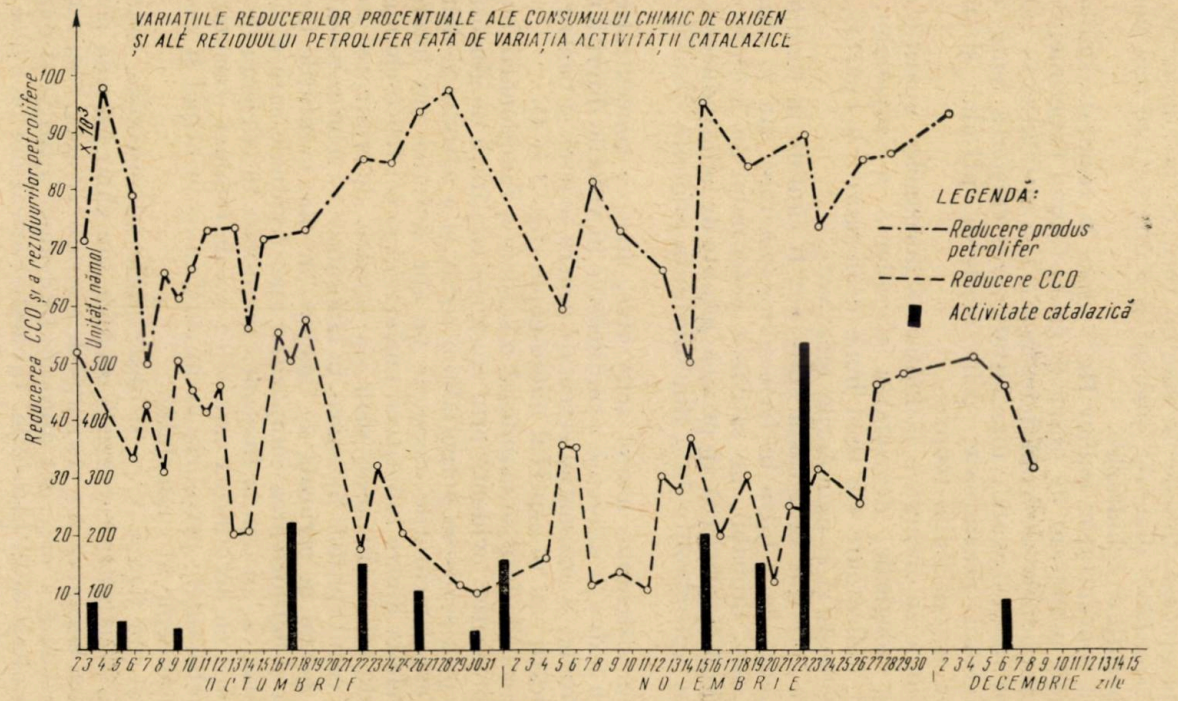


Fig. 5. — Variațiile reducerilor procentuale ale consumului chimic de oxigen și ale reziduului petrolier față de variația activității catalazice.

La sistemul nămol activ-glucoză mărirea dozei de cianuri nu schimbă valorile apropiate între martor şi nămol intoxicat în ceea ce priveşte consumul chimic şi cel biochimic de oxigen. Se manifestă o diferenţiere între cantităţile de glucoză rămase în sistem, ceea ce presupune o oarecare inhibare în asimilarea glucozei, precum şi o diferenţiere mai mare între valorile activităţilor dehidrazice.

Mărirea concentraţiei ionilor Hg^{++} duce la rezultate similare.

Este însă interesant de observat că în timpul experimentărilor s-a observat o funcţionare oarecum defectuoasă şi a instalaţiei în care există probe martor (neintoxicată), manifestată prin creşterea lentă, dar continuă a glucozei neasimilate, prin scăderea pH-ului şi mai ales prin scăderea potenţialului redox.

Microscopic se observă o fărîmiţare a flocoanelor, apariţia dificilă a formaţiunilor zoogleale, dezvoltarea abundentă a ciupercilor, rărirea organismelor indicatoare ale unei bune desfăşurări a epurării. Acelaşi aspect se întîlneşte şi la nămolurile intoxicate.

Cauzele care duc la această stare pot fi căutate în tendinţa soluţiilor de glucoză de a intra în fermentare anaerobă sau în alimentarea discontinuă care, probabil, nu satisface potenţialul de hrănire a nămolului activ (după datele CCO, în primele minute de la introducerea soluţiei de alimentare aproximativ 50% din substanţa organică dispare din faza apoasă).

În cazul sistemului nămol activ-uree, mărirea concentraţiei ionilor de mercur nu a dus la diferenţe semnificative în valorile diferiţilor indicatori fizico-chimici şi enzimatici cercetaţi pentru martor şi pentru nămolul supus intoxicării sau în aspectul microscopic (fig. 3 şi 4).

Şi în cazul de faţă se manifestă o scădere a funcţionării bune a nămolului activ martor, evidentă prin creşterea cantităţii de glucoză rămase neasimilate, prin scăderea potenţialului redox şi a activităţii dehidrazice.

După experimentările efectuate pe ape sintetice era interesant de verificat corelaţia dintre indicatorii enzimatici şi cei fizico-chimici pe ape reziduale industriale. În acest scop s-a urmărit determinarea activităţii catalazice în cazul epurării biologice, în laborator, a apelor reziduale de la o rafinărie de petrol în perioada de început, în care greutăţile inerente în amorsare, ca şi definitivarea compoziţiei apei reziduale care să ajungă la epurarea biologică, au dus la fluctuaţii însemnate în eficienţa de epurare.

În paralel cu activitatea catalazică s-a determinat consumul chimic de oxigen, substanţele petroliere ca impurificator principal şi s-a urmărit aspectul microscopic al nămolului.

Graficul din figura 5, ca şi observaţiile microscopice, arată faptul interesant că activitatea catalazică coincide sau chiar precedă perioadelor de variaţie mai accentuată a eficienţei de epurare. În acest caz, o activitate catalazică crescută a precedat aproape totdeauna apariţia şi dezvoltarea organismelor altele decît bacteriile. Tabloul observaţiilor biologice constată existenţa unor flocoane formate din bacterii cu masa gelatinoasă puţin dezvoltată. Pe suprafaţa flocoanelor circulă ciliate (*Lionotus*, *Glaucoma*, *Colpidium*), amibe mici, flagelate, nematode şi rare opercularii. În perioadele în care analizele chimice arată o slabă epurare, se constată că pro-

tozoarele scad numeric, ultimele care dispar fiind de obicei nematodele. La fiecare refacere a faunei primele care apar sînt flagelatele.

Valorile activității catalazice au variat de la 0,040 de unități pe g de nămol umed în cazul unei reduceri mai mici a consumului chimic de oxigen sau a substanțelor petroliere la peste 0,200 de unități în cazul unei reduceri bune.

Date asemănătoare s-au obținut și în cazul epurării biologice a apelor reziduale obținute de la fabricarea celulozei din stuf [11].

Totuși, pentru stabilirea valorilor activităților enzimatice ca un criteriu de bună funcționare a instalațiilor de epurare biologică, mai sînt necesare încă numeroase determinări statistice.

Rezultatele prezentate arată că :

1. Activitățile unor enzime oxidoreducătoare (catalaza, dehidraza) și a ureazei din nămolul activ urmăresc îndeaproape variațiile altor indicatori fizico-chimici uzuali în controlul instalațiilor de epurare.

2. Între variațiile activităților enzimatice date și aspectul biologic al nămolului există corelație.

3. Dintre indicatorii chimici cercetați (CCO, CBO_5, produs principal de epurat — în cazul nostru glucoza, respectiv produsul petrolier), cea mai bună indicație a unei deranjeri metabolice pare să o furnizeze valoarea produșilor principali de epurat neconsumați.

4. Determinările efectuate asupra activităților enzimatice cercetate pot duce la introducerea unei metode de lucru precise, sensibile și rapide pentru stabilirea stării de funcționare a unui nămol activ.

Institutul de studii și cercetări hidrotehnice,
Secția protecția și epurarea apelor, București

Prezentată la redacție
la 6 august 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Bick H., La Tribune du CEBEDEAU, **17**, 243 (1964).
2. Bucksteeg W. Thiele H., Gas und Wasserfach, *100*, 916 (1959).
3. Collowick P., Kaplan S., *Methods in Enzymology*, vol. **II**, Reinhold Publishing Corporation, N. Y., 1955.
4. Gainey P., Lord T., *Microbiology of water sewage*, Prentice-Hall, N.Y., 1957.
5. Köppen R., Gesundheits—Ingenieur, **76**, 147 (1955); **77**, 282 (1956).
6. Liebmann H., *Handbuch der Frischwasser-und Abwasserbiologie*, R. Oldenbourg, München, 1958.
7. Liubimov V., Kagan S., Ghighiena i sanitaria, **1**, 16 (1955).
8. Matsushita Shiro, Chemical Abstracts, 1304 f (1962).
9. Symmons J., Mckinney R., Hassis H., J. Water Pollution Control Federation, august 1960.
10. Thon D., Vom Wasser, **25**, 209 (1958).
11. Vaicum L., Godeanu S., Cute E., *Cercetări privind corelația între caracteristicile apei de alimentare și desvoltarea organismelor în epurarea biologică cu nămol activ a apelor reziduale provenite de la fabricarea celulozei sulfat din stuf*, St. protecția și epurarea apelor, **6** (1965).
12. Viswanathan C., Naturwissenschaften, **48**, 101 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 1, 109 – 119 (1965)

STUDIUL REPARTIȚIEI ȘI METABOLIZĂRII SUBSTANȚELOR CITOSTATICE ENDOXAN ȘI TSPA, MARCATE CU ^{32}P, LA ȘOBOLANI*

NICOLAE VOICULEȚ, FILIP CHIRALEU și CONSTANTIN VILĂU

616 – 006.085

Rezumat. — S-au studiat cinetica de repartiție sanguină și tisulară și metabolizarea endoxanului ^{32}P și TSPA—^{32}P pe șobolani normali. Cele două substanțe prezintă o repartiție diferită. TSPA și produșii de metabolizare se elimină în proporție de 64%, pe cînd endoxanul în proporție de 26%. Endoxanul pare a fi complet metabolizat în 24 de ore. Timpul biologic de înjumătățire diferă pentru cele două substanțe în funcție de organ, fiind identic numai în mușchi și splină, organe care probabil nu pot fi implicate în procesele metabolice ale acestor substanțe.

Lipsa de electivitate tumorală a substanțelor citostatice și efectele nocive pe care ele le produc la nivelul țesuturilor extratumorale impun necesitatea cunoașterii repartiției și metabolizării tisulare, precum și a ritmului de eliminare a acestor substanțe. Considerînd organismul uman sau animal ca un sistem multicompartimental [1], stabilirea acestor parametri pe compartimente biologice apare necesară nu numai pentru aprecierea dozei la tumoare, expresie a eficienței terapeutice, ci și pentru evaluarea efectelor toxice extratumorale pe care le produc aceste substanțe. Realizarea acestui tablou în funcție de timp și de substanța utilizată, pe lîngă că ar permite o utilizare mult mai rațională a acestor substanțe în clinică [2], ar putea furniza informații utile și pentru asigurarea unor măsuri terapeutice de protecție.

Deoarece metodele fizico-chimice existente nu prezintă decît posibilități reduse de apreciere a gradului de concentrație tisulară a substanțelor citostatice administrate, folosirea de preparate marcate cu izotopi radioactivi permite, prin determinarea activității specifice, o apreciere mult mai exactă.

Din curbele exponențiale este posibil să se determine timpul biologic de înjumătățire pentru fiecare organ și substanță, fapt care reflectă ritmul de eliminare a substanței sau a metaboliților radioactivi din organul respectiv și care permite aprecierea timpului de acțiune a medicamentului folosit.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba engleză.

Pornind de la aceste premise, în lucrarea de faţă ne-am propus să studiem cinetica repartiţiei sanguine, tisulare şi ritmul de eliminare a două dintre citostaticele cele mai folosite în terapia oncologică, endoxan şi TSPA (Tio-TEPA), administrate sub formă radioactivă.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele s-au efectuat pe un număr de 49 de şobolani Wistar, în greutate de 130 ± ± 10 g. S-au administrat intravenos 10 mg/kg greutate corporală TSPA (N, N′, N″, trietilen-tiofosfamidă, $C_6H_{12}N_3{}^{32}PS$, Radiochemical Centre Amersham), cu o activitate specifică de 15 μC/mg. Animalele au fost sacrificate prin decapitare la următoarele intervale de timp: 30 min, 2, 4, 18, 24 de ore, 3 şi 6 zile, cîte şapte pentru fiecare timp.

S-au prelevat: sînge, creier, ficat, splină, rinichi, plămîni, muşchi striat şi intestin subţire. Urina a fost recoltată prin păstrarea animalelor în cuşti individuale, prevăzute cu colector. S-a separat plasma şi s-a măsurat radioactivitatea pe un volum de 0,5 ml. Radioactivitatea urinei s-a măsurat în aceleaşi condiţii. Ţesuturile umede au fost imediat cîntărite şi omogenizate, realizîndu-se o concentraţie de 50 mg ţesut/ml apă distilată. S-a trecut 1 ml de omogenat pe ţinte, în duplicat, iar radioactivitatea s-a măsurat la o instalaţie automată FH 49 (Friescke & Hoepfner).

La un alt lot de 49 de şobolani Wistar, avînd aceeaşi greutate medie, s-au administrat 50 mg de endoxan/kg greutate corporală (N′, N-bis/betacloretil) N′, o-propilen diamid esterfosforic C_7H_{15}, $N_2O_2{}^{32}PCl_2$. H_2O-Radiochemical Centre Amersham), cu o activitate specifică de 5 μC/mg şi s-a procedat întocmai ca mai sus.

REZULTATE

S-a calculat absorbţia diferenţială după formula:

$$\text{a.d. } \% = \frac{\text{Radioactivitatea ţesutului umed (pulsuri/min/g)}}{\text{Radioactivitatea cantităţii administrate (pulsuri/min/g corp)}}$$

Valorile obţinute sînt înscrise în tabelul nr. 1, din care se observă pentru TSPA o activitate maximă în primele 30 min în rinichi, ficat şi intestinul subţire. Activitatea în splină şi plămîn este medie, iar în creier şi plasmă scăzută. La 2 şi 4 ore activitatea scade aproape în toate compartimentele, rămînînd totuşi ridicată în ficat, rinichi şi intestin; se remarcă o creştere în urină. La 18 ore activitatea atinge un minim în toate organele şi un maxim în urină, corespunzînd unei eliminări accentuate a substanţei şi a metaboliţilor radioactivi. La 1, 3 şi 6 zile radioactivitatea din toate organele scade lent.

Reprezentarea grafică în coordonate semilogaritmice a absorbţiei diferenţiale a permis trasarea curbelor exponenţiale pentru fiecare organ (fig. 3—8) şi calcularea timpilor biologici de înjumătăţire (tabela nr. 3). Din figuri se constată că pentru TSPA curbele apar compuse din două exponenţiale simple, de forma $Y = a.e^{-Kt}$, în care Y = a.d. %, a = constanta, K = panta dreptei semilogaritmice, t = timpul. Curbele diferă între ele prin coeficientul k.

Tabela nr. 1

Absorbția diferențială % a TSPA la diferite intervale de timp de la administrare
(Valori medii din 7 determinări)

Organul / Timpul de sacrificare	1/2 h	2 h	4 h	18 h	24 h	3 zile	6 zile
Creier	42,1 ± 7,5	37,8 ± 2,9	24,4 ± 2,1	6,4 ± 0,42	6,2 ± 0,64	11 ± 1,2	10,3 ± 2,05
Ficat	101,4 ± 7,75	76,9 ± 7,4	61,4 ± ^{4,1}	38,2 ± 3,7	38,2 ± 4,7	34,9 ± 11,4	26,9 ± 6,4
Splină	74,5 ± 4,1	53,4 ± 5,0	37,4 ± 3,1	22,6 ± 1,1	24,5 ± 3,1	19,3 ± 1,3	16,2 ± 1,05
Rinichi	199,4 ± 71,^{2}	83,9 ± 11,^{2}	59,5 ± 9,4	29,3 ± 2,45	27,7 ± 3,3	28,4 ± 8,1	21,2 ± 6,8
Mușchi	60,8 ± 8,9	42,1 ± 4,2	28,9 ± 4,9	10,7 ± 0,84	10,3 ± 1,1	17,6 ± 5,3	17,7 ± 4,6
Plămîn	76,6 ± 6,^{01}	55,4 ± 4,2	37,0 ± 3,6	19,1 ± 1,3	20,1 ± 2,7	13,8 ± 0,45	16,7 ± 6,6
Intestin	111,4 ± 32,^{5}	93,9 ± 6,8	55,8 ± 7,9	32,3 ± 4,3	26,8 ± 2,6	13,5 ± 4,6	16,3 ± 6,02
Plasmă	52,3	53,0	26,8	2,4	2,3	2,3	0,9
Urină	10,38	17,14	54,6	63,61	65,46	—	—

Tabela nr. 2

Absorbția diferențială % a endoxanului la diferite intervale de timp de la administrare
(Valori medii din 7 determinări)

Organul / Timpul de sacrificare	1/2 h	2 h	4 h	18 h	24 h	3 zile	6 zile
Creier	20,4 ± 2,8	10,0 ± 0,78	3,1 ± 0,57	1,1 ± 0,8	1,7 ± 0,24	2,0 ± 0,35	1,2 ± 0,48
Ficat	90,9 ± 3,95	58,6 ± 4,9	42,9 ± 8,0	22,8 ± 6,5	25,4 ± 5,8	7,5 ± 0,83	5,0 ± 0,75
Splină	49,8 ± 2,7	41,2 ± 4,8	23,3 ± 4,8	12,8 ± 3,2	15,9 ± 4,2	5,4 ± 0,72	4,4 ± 0,68
Rinichi	135,6 ± 10,9	112,8 ± 8,9	64,5 ± 10,8	18,4 ± 5,0	24,3 ± 5,9	6,3 ± 1,3	4,2 ± 0,37
Mușchi	40,7 ± 4,1	31,6 ± 3,1	18,4 ± 3,0	9,1 ± 1,9	13,5 ± 2,1	5,9 ± 1,05	4,4 ± 0,2
Plămîni	70,1 ± 3,7	36,3 ± 5,05	29,7 ± 8,5	11,7 ± 3,3	14,2 ± 3,35	4,4 ± 0,54	3,8 ± 0,29
Intestin	70,9 ± 9,5	54,3 ± 6,2	29,5 ± 7,6	14,9 ± 4,9	17,1 ± 4,8	6,1 ± 0,96	3,3 ± 0,32
Plasmă	51,4	26,8	12,0	1,9	2,1	0,8	0,6
Urină	12,75	22,7	24,5	26,7	20,0	—	—

La endoxan (tabela nr. 2), concentrația maximă se observă în rinichi, ficat, intestin și plămîn în primele 30 min, celelalte compartimente indicînd activități inferioare. Epurarea plasmatică este mult mai rapidă decît la TSPA (tabela nr. 3). În toate organele se remarcă la 18 ore un minim, iar la 24 de ore se înregistrează o creștere, urmată de o eliminare accentuată. Transpunerea procentelor calculate în reprezentare semilogaritmică ne-a permis să facem o analiză matematică a dinamicii substanței folosite. Spre deosebire de TSPA, curbele realizate pentru endoxan sînt compuse din trei exponențiale simple cu pante foarte diferite între ele.

Tabela nr. 3

Timpul biologic de înjumătățire (T 1/2) în ore determinat în diferite organe

Organul	Endoxan	TSPA
Creier	1,29	5,05
Ficat	2,6	4,5
Splină	3,55	3,38
Rinichi	3,06	2,0
Mușchi	3,08	3,02
Intestin	2,98	3,70
Plămîn	2,31	3,15
Plasmă	1,59	3,96

Din panta curbelor stabilite de la 0 la 4 ore s-a determinat T 1/2 pentru fiecare țesut, observîndu-se diferențe importante de organ și substanță (tabela nr. 3). Din tabelă se remarcă o dispariție mult mai rapidă din circulația sanguină a endoxanului (T 1/2 = 1,59 ore) decît a TSPA (T 1/2=3,96 ore). De asemenea ficatul elimină endoxanul sau metaboliții radioactivi rezultați cu o viteză aproape dublă față de TSPA. În unele organe, ritmul de eliminare este identic. De remarcat că eliminarea urinară în primele ore este mult mai accentuată la TSPA decît la endoxan.

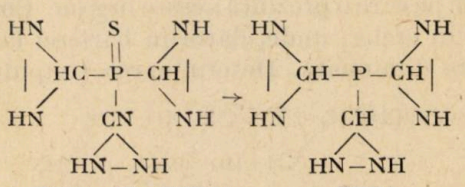
DISCUȚII

Din analiza rezultatelor obținute se remarcă deosebiri în repartiția și ritmul de eliminare a celor două substanțe folosite. Aceste fapte relevă procesele metabolice diferite la care sînt supuse aceste două substanțe în organismul viu [3] [4], justificate de altfel și de structura lor chimică deosebită.

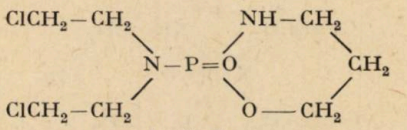
TSPA prezintă grupările etilenice sub formă ciclică legate de un atom de P (fig. 1 a), iar endoxanul, sintetizat după principiul „formă de transport — formă activă" [5], are grupările etilenice libere, însă grefate pe o structură ciclofosfamidică care blochează activitatea lor (fig. 1 b).

Substanțele citostatice neprezentînd o electivitate de organ, iar prezența tumorii neinfluențînd cinetica de repartiție [6] [7], am efectuat experiențe pe animale nepurtătoare de tumori. Din tabelele nr. 1 și 2 se observă că organele cu activitate metabolică și de excreție intensă se caracterizează printr-un procent ridicat de încorporare. Pentru endoxan, rinichiul, ficatul și mucoasa intestinală, iar pentru TSPA rinichiul, mucoasa intestinală și ficatul sînt organele cu gradul cel mai crescut al radioactivității. Concentrația crescută a radioactivității în țesutul renal relevă eliminarea rapidă a substanțelor citostatice și a metaboliților marcați rezultați din scindarea moleculelor. Existența radioactivității crescute în ficat la experiențele cu endoxan concordă cu datele lui Bolt și colab. (3), care,

folosind un dublu marcaj al moleculei de endoxan (gruparea iperitică cu ^{3}H, iar gruparea ciclofosfamidică cu ^{32}P), au demonstrat existența unei activități specifice mari a ^{32}P în ficat. În schimb, Nadkarni și colab. [4],



a. TSPA (Tio-TEPA) c. TEPA



b. Endoxan

Fig. 1. — Formulele chimice ale TSPA, endoxan și TEPA.

folosind TE^{32}PA, au observat o încorporare superioară în mucoasa intestinală, fapt pe care-l confirmă experiențele noastre pentru TS^{32}PA, care de altfel prezintă un comportament metabolic asemănător cu TEPA [8], [9].

Din analiza matematică a curbelor exponențiale se pot obține informații asupra desfășurării unor procese metabolice la care sînt supuse substanțele marcate. După administrarea intravenoasă se remarcă o accentuare a activității în toate organele, urmată de o descreștere datorită eliminării substanței sau metaboliților rezultați. După 18 ore, la endoxan se remarcă o activitate minimă, pentru ca la 24 de ore în toate organele să apară un maxim de activitate, urmat de o scădere. Aceste modificări în concentrația radioactivă a țesuturilor se datoresc reapariției în circulația sanguină și fixării la nivelul organelor a produșilor metabolici marcați ce rezultă prin scindarea moleculei. După Foley și colab. [10], desfacerea moleculei de endoxan în organism s-ar putea realiza pe trei căi.

Produșii rezultați pe căile a și c pot fi metabolizați pînă la fosfat, a cărui reutilizare tisulară determină o apariție a activității relative mai ridicată la 24 de ore.

Spre deosebire de endoxan, molecula de TSPA este mai repede metabolizată; după Craig în 20 min, iar după Mellet în 120 min; în plasmă, TSPA este transformată în TEPA (fig. 1 c) în proporție de 50% [8] [9]. Astfel desfășurarea proceselor metabolice la care este supusă TSPA se poate explica cu ușurință după schema metabolică a TEPA.

Faptul că procesele metabolice la care este supus endoxanul implică mai multe faze decît TSPA, care practic s-ar elimina într-o proporție foarte mare sub formă de TEPA [11], se reflectă și în gradul de eliminare urinară (pentru endoxan = 26,7%, iar pentru TSPA = 64% la 18 ore).

Repartizarea concentraţiei în celelalte organe — muşchi, splină, plămîn şi creier — a fost influenţată, probabil, de gradul de irigaţie a acestor organe. În splină şi plămîn activităţile sînt crescute, desigur, datorită vascularizaţiei mai intense pe care o prezintă aceste organe. Concentraţia cea mai scăzută se remarcă în creier, unde, datorită barierei hematoencefalice, difuzia substanţei este diminuată. Determinarea timpului biologic de înju-

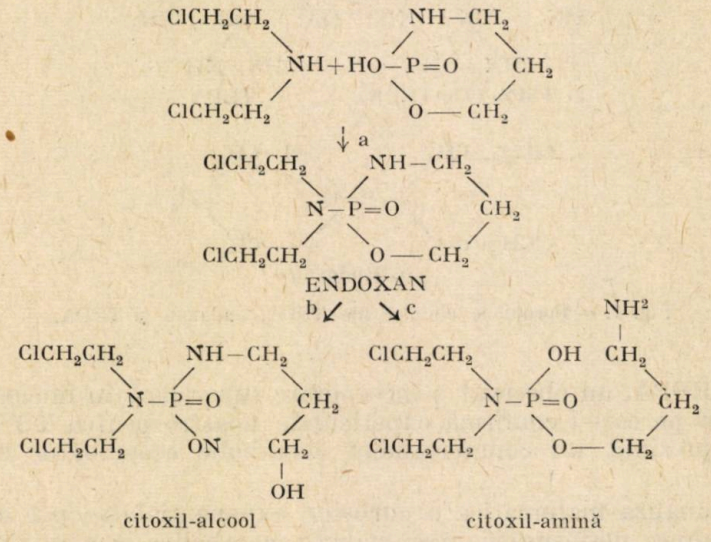


Fig. 2. — Căile posibile de hidroliză *in vivo* a endoxanului (După Foley şi colab.).

mătăţire (tabela nr. 3) pentru fiecare organ prezintă o importanţă deosebită din punct de vedere farmacologic. Această constantă, pe lîngă că permite aprecierea timpului de acţiune a unei substanţe în organul respectiv, poate fi folosită şi ca indice pentru găsirea unor substanţe cu rol potenţator al acţiunii tumorale a citostaticelor folosite în clinica umană sau cu rol de accelerator al eliminării acestora. Determinat din prima curbă a exponenţialei realizată între 0 şi 4 ore, considerăm că T 1/2 corespunde substanţei respective integrale, metaboliţii nefiind implicaţi în componenţa exponenţială. Aceste date sînt susţinute şi de experienţele lui Foley [10], care, folosind serul şi omogenatele de ficat de la animale tratate cu endoxan, obţine la 4 ore de la administrare o acţiune inhibitoare pe linii celulare în culturi primare.

Extinderea cercetărilor experimentale şi clinice în acest domeniu şi interpretarea rezultatelor din punctul de vedere al cineticii repartiţiei sanguine şi tisulare, al vitezei de metabolizare, al ritmului de eliminare a substanţelor citostatice din organismul animal şi uman ne oferă indicaţii precise asupra mecanismului de acţiune şi asigură o utilizare mai raţională a acestor preparate în diferite localizări ale bolii canceroase.

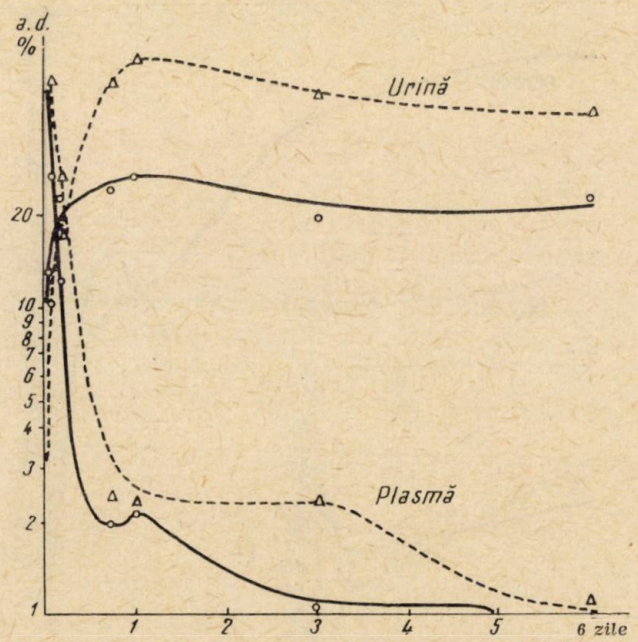


Fig. 3. — Curba de eliminare plasmatică şi urinară a ENDOXANULUI (O——O) şi TSPA (Δ – – – Δ).

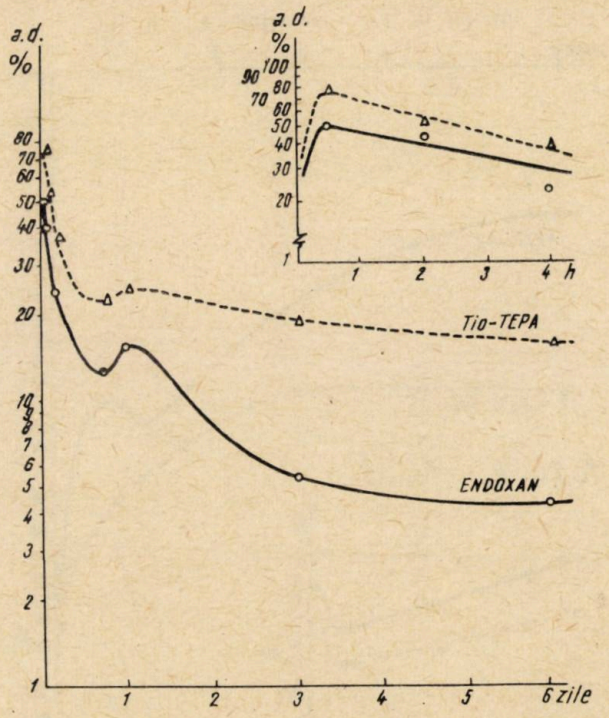


Fig. 4. — Evoluţia activităţii în ficat.

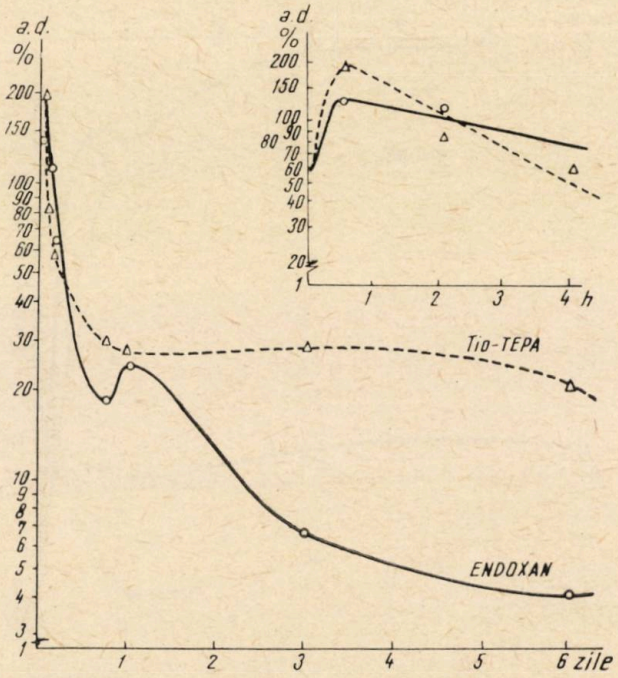


Fig. 5. — Evoluția activității în rinichi.

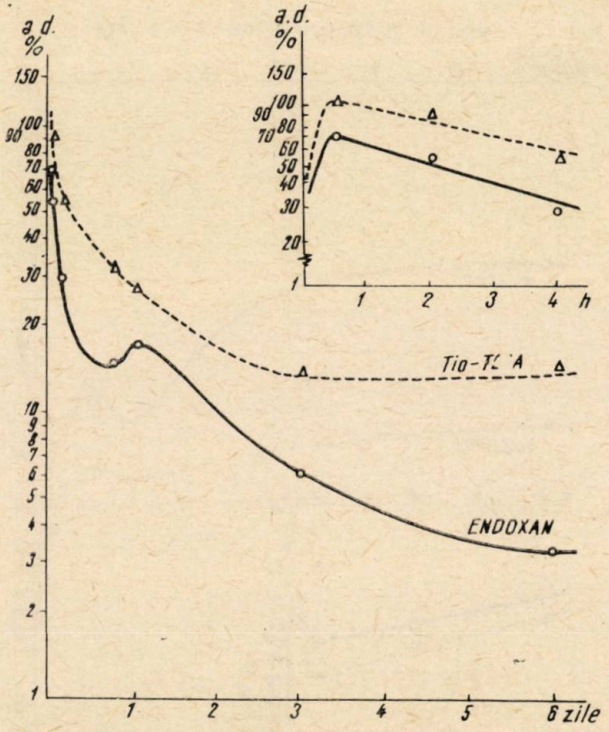


Fig. 6. — Evoluția activității în intestin.

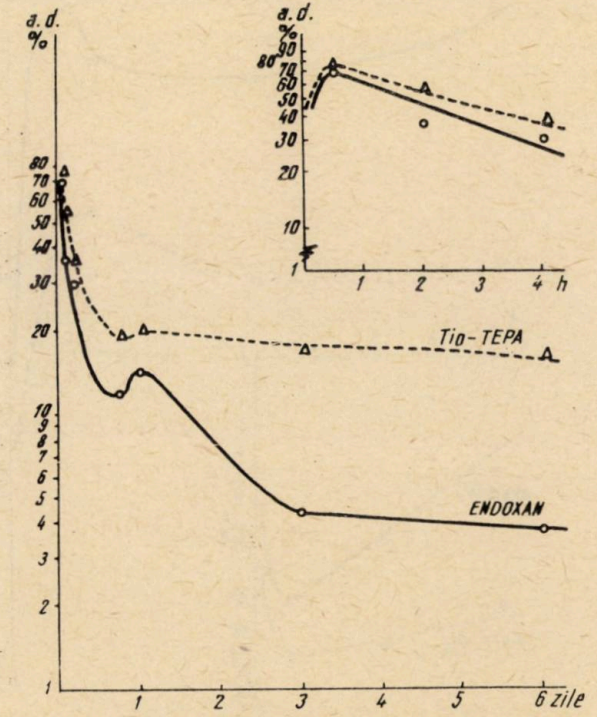


Fig. 7. — Evoluţia activităţii în splină.

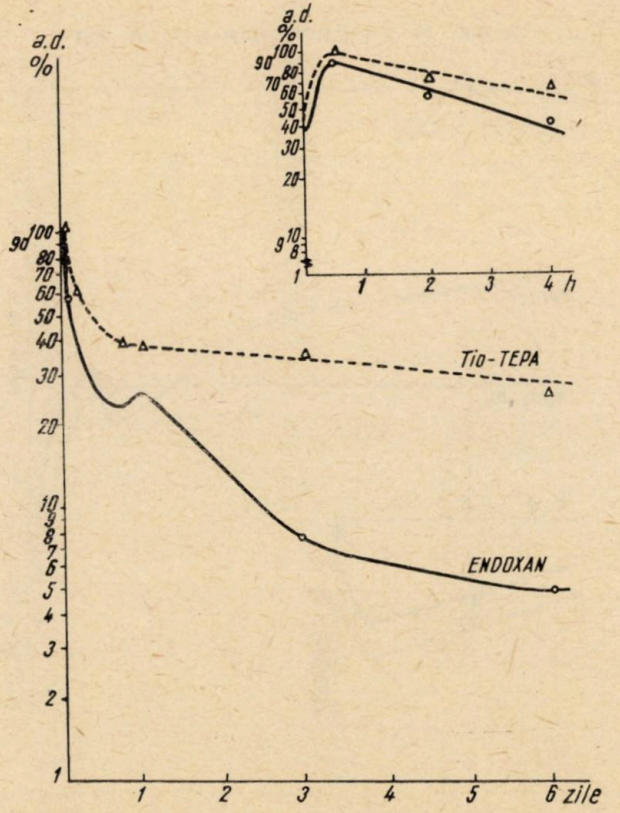


Fig. 8. — Evoluţia activităţii în pulmon.

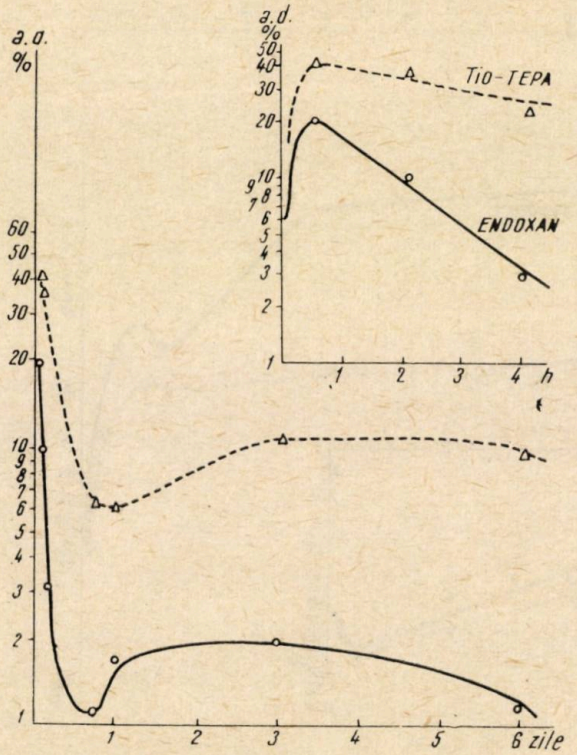


Fig. 9. — Evoluţia activităţii în creier.

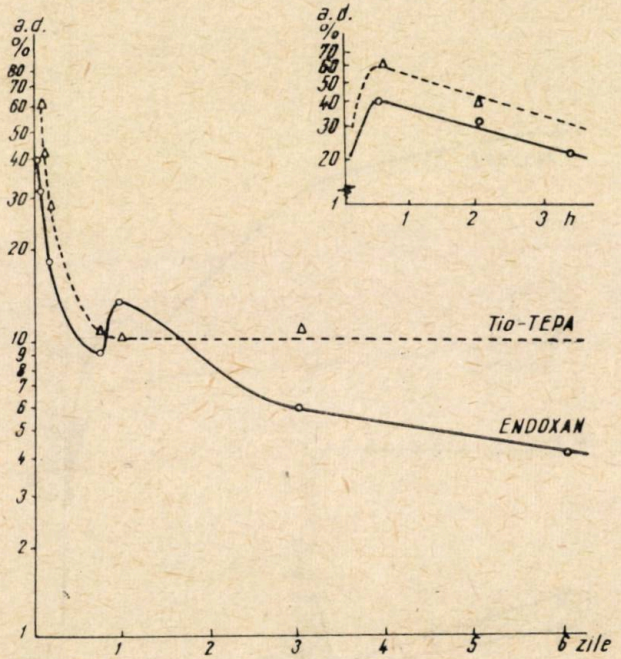


Fig. 10. — Evoluţia activităţii în muşchi.

CONCLUZII

1. Endoxanul și TSPA prezintă o cinetică de repartiție diferită.
2. TSPA și produșii de metabolizare radioactivi se elimină în primele 18 ore în proporție de 64%, pe cînd endoxanul numai în proporție de 26%.
3. Endoxanul pare să fie complet metabolizat în 24 de ore.
4. T 1/2 biologic diferă pentru ambele substanțe în funcție de organ, fiind identic numai pentru mușchi și splină, organe care, probabil, nu pot fi implicate în procesele metabolice ale acestor substanțe.

Institutul oncologic București,
Serviciul de medicină nucleară

Prezentată la redacție la 2 iulie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. TĂUTU P., VOICULEȚ N., *Înregistrarea continuă a concentrației de ENDOXAN^{32}P și TSPA ^{32}P în tumorile experimentale.* Comunicare USSM, Soc. de oncologie, 30.IX.1963.
2. MANDEL G., *The physiological Disposition of some Anticancer Agents,* Pharm. Review, **11**, *4*, 743—837 (1959).
3. BOLT W., RITZL F., NAHRMANN H., *Untersuchungen mit einem tritium markierten N-Lost. Derivat in der Karzinombehandlung.* Strahlenforschung u. Strahlenbehandlung, *4*, 166—170 (1963).
4. NADKARNI V. M., GOLDENTHAL E. I., SMITHK K. P., *The Distribution of Radioactivity following Administration of Thriethylenimino-s-triazime-C^{14} in Tumor Bearing and Control Mice,* Cancer Res., **17**, 97—101 (1957).
5. BROCK N., *Neue experimentalle Ergebnisse mit N-Los Phosphamidestern- Sonderbände zur Strahlentherapie,* 1959, **41**, 347—354.
6. NADKARNI V. M., TRAMS S. E., SMITH K. P., *Preliminary Studies on the Distribution and Fate of TEM TEPA and Myleran in the Human,* Cancer, **19**, *7*, 713—718 (1959).
7. WHEELER G. P., *Studies Related to the Mechanism of Action of Cytotoxic Alkylating Agents.* Cancer Res., **22**, *6*, 651—688 (1962).
8. POMMATAN E., DARGENT M., REVILLARD J. P., *Thio-TEPA dans le treatment des tumeurs malignes,* Sem. Hôp., 8/2, 451—455 (1964).
9. CRAIG A. W., FOX B. W., JACKSON H., *Tracer Studies of the Metabolism of the Tumour Inhibitor Triethylenthiophosforamide,* Biochem. J., **69**, 169 (1958).
10. FOLEY G. E., FRIEDMAN O., DROLET B., *Studies of the Mechanism of Action of Cytoxan. Evidence of Activation in Vivo and in Vitro,* Cancer Res., **21**, *1*, 57—63 (1961).
11. CRAIG A. W., JACKSON H., *The Metabolism of ^{32}P labelled Triethylene-phosphoramide in Relation to its Antitumor Activity,* Brit. J. Pharmacol., **10**, 321—325 (1955).

ERNEST KAHANE, *La Vie n'existe pas* (Viaţa nu există), Éditions Union Rationaliste, Paris, 1962, 257 p.

După o prefaţă semnată de acad. A. I. Oparin, care rezumă actuala concepţie materialist-dialectică despre natura, originea şi extensiunea vieţii în univers, autorul, E. Kahane, profesor de chimie biologică la Facultatea de Ştiinţe din Montpellier şi secretar al Uniunii naţionaliste din Franţa, prezintă o expunere substanţială şi foarte atrăgătoare asupra ultimelor cuceriri ştiinţifice privitoare la caracteristicile fundamentale ale materiei vii. Folosind o bogată şi variată documentare, el arată, într-un stil plin de vervă, confirmarea permanentă a interpretărilor materialist-dialectice, împotriva celor metafizice sau spiritualiste, în ceea ce priveşte problemele cardinale ale biologiei. Pentru a sublinia că viaţa nu cuprinde nici un principiu vital specific, nici un element străin mişcării materiei la cel mai înalt şi mai subtil nivel de organizare, autorul adoptă titlul paradoxal al cărţii sale, *Viaţa nu există*, în sensul negării tuturor tendinţelor vitaliste.

În cele 9 capitole ale lucrării sînt analizate aspectele metodologice, teoretice şi filozofice legate de cercetarea proprietăţilor biologice esenţiale : clarificarea deosebirilor dintre inert şi viu ; refugiile succesive ale ipotezelor idealiste în declin ; consolidarea concepţiei materialist-dialectice, critica definiţiei date vieţii de Engels, în lumina rezultatelor biochimice actuale ; progresele realizate în problema originii vieţii ; activitatea enzimatică, nivelele de structură ale materiei vii şi inepuizabila lor complexitate ; semnificaţia biologică a virusurilor ; rolul acizilor nucleici şi raporturile dintre metabolism şi autoreproducere ; importanţa ciberneticei şi a conexiunilor retroactive în explicarea fenomenelor de autoreglare şi adaptare ; rezolvarea contradicţiei dintre determinism şi liberul arbitru prin recunoaşterea acţiunii naturale a gîndirii asupra materiei ; posibilitatea interpretării proceselor psihice de prevedere şi finalitate fără intervenţia metafizicii ; manifestările morţii şi interrelaţiile lor cu expansiunea vieţii.

Prin talentul polemic, noutatea informaţiei şi originalitatea multor concepţii, autorul reuşeşte să captiveze atenţia de-a lungul întregului volum, care se citeşte cu profit şi plăcere.

Prof. Radu Codreanu
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.

Sub redacţia lui ASEN A. HADJIOLOV : *Osnovi na funkţionalnata biohimiia* (Bazele biochimiei funcţionale). Autorii : BUCUREŞTLIEV A. D., BACIVAROV R. J., GACEV E. P, GOLOVINSCHI E. V., DANCEVA K. J., JELIASCOV D. K., ILCOV A. T., KALIŢIN D. S., MARCOV G.G., NICOLOV T. K., SAEV G. K., SAMSONOVA S. P., STANCEV B. D., HADJIOLOV A. A., ŢANEV R. G. Editura Mediţina i fizikcultura, Sofia, 1964, Bulgaria.

În luna noiembrie 1964 a apărut la Sofia — în limba bulgară — cartea *Bazele biochimiei funcţionale*, sub redacţia lui Asen A. Hadjiolov.

Lucrarea, editată în bune condiții, cuprinde, într-o formă sintetică, numeroase aspecte teoretice și experimentale de biochimie funcțională a celulei, țesuturilor, organelor animale și umane.

În prefață, scrisă de cunoscutul biochimist sovietic academicianul V. A. Engelhardt, se subliniază că în momentul de față sarcina principală a cercetătorilor care lucrează în domeniul biochimiei este aceea de a lămuri ce procese biochimice condiționează diferitele funcții ale organismelor vii. Aceasta este o etapă nouă în dezvoltarea biochimiei ca știință, și anume etapa biochimiei funcționale.

Cartea cuprinde 650 de pagini, cu 16 capitole, grupate pe două mari probleme : bazele biochimice ale funcțiilor celulare (primele 4 capitole) și bazele biochimice ale funcțiilor în organismul animal și uman (restul de 12 capitole).

În capitolul I, după o introducere ce conține datele morfologice, precum și teoriile actuale privind structura moleculară a membranelor, se tratează în continuare mecanismele generale ale permeabilității selective celulare și transportului activ prin membranele vii.

Capitolul al II-lea se ocupă de generarea și acumularea de energie în celulă. Se expune modelul general al proceselor metabolice celulare, insistîndu-se asupra substanțelor macroergice. Se trece apoi la rolul mitocondriei în energetica celulară, analizîndu-se structura, compoziția chimică a acesteia și felul cum se desfășoară în mitocondrie procesele respiratorii, fosforilarea oxidativă. În încheierea capitolului, se discută modul în care se face reglarea funcțiilor mitocondriale.

Capitolul al III-lea prezintă datele moderne despre ultrastructura și compoziția chimică a nucleului celular, despre biosinteza acizilor dezoxi- și ribonucleici, structura ergastoplasmei, apoi tratează despre biosinteza proteinelor în celulă.

Capitolul următor se ocupă pe larg de biochimia diviziunii celulare și de mecanismele biochimice care reglează acest proces.

Capitolele ce se referă la bazele biochimice ale funcțiilor organismului animal și uman încep cu cel rezervat biochimiei digestiei. În acest capitol (al V-lea) sînt analizate competent problemele legate de secreția enzimelor digestive (fazele și metodele de studiu al activității secretorii, absorbția substanțelor necesare pentru sinteza enzimelor digestive, sinteza enzimelor digestive, eliminarea produsului secretor de către celulă, influența și energetica proceselor secretorii). În continuarea capitolului autorii se ocupă de mecanismele moleculare ale activării precursorilor enzimelor proteolitice, precum și de secretarea de către mucoasa gastrică a acidului clorhidric.

Capitolul al VI-lea tratează biochimia hematopoiezei, bazele fizico-chimice și chimice ale transportului de gaze de către sînge, precum și transportul substanțelor nutritive.

În capitolul al VII-lea se dezbat unele aspecte ale biochimiei funcționale hepatice, în capitolul al VIII-lea caracteristicile biochimice generale ale funcției renale, în capitolul al IX-lea structura și biochimia funcțională a țesutului conectiv, iar în capitolul al X-lea biochimia lactației.

Capitolul al XI-lea cuprinde mecanismele biochimice ale funcțiilor de apărare ale organismului. Sînt tratate aici probleme ca : biosinteza anticorpilor, detoxifierea compușilor organici în organism, biochimia coagulării sîngelui, biochimia cheratinizării normale a epidermei și, în sfîrșit, biochimia pigmentării pielii.

În capitolul al XII-lea se tratează date legate de biochimia activității musculare.

Capitolul următor se ocupă de mecanismele biochimice ale biosintezei și de mecanismul de acțiune al hormonilor (hormonii pituitari, tiroidieni și paratiroidieni, pancreatici, hormonii țesutului cromafin, precum și hormonii steroizi).

În capitolul al XIV-lea se prezintă datele ce privesc biochimia funcţională a sistemului nervos.

Penultimul capitol se ocupă de analiza farmacologică şi de biochimia funcţională a sistemului nervos central.

Ultimul capitol tratează despre mecanismele biochimice ale fecundării (fertilizării).

Din această succintă trecere în revistă a conţinutului cărţii nu putem să omitem vasta bibliografie pe care au folosit-o autorii. Astfel, la sfîrşitul fiecărui capitol se dau indicaţii bibliografice aduse la zi (pînă în 1963 inclusiv), care permit cititorului interesat să adîncească cunoştinţele respective. În această privinţă, cîteva cifre sînt edificatoare : cartea conţine 5 206 indicaţii bibliografice, peste 260 de figuri şi scheme, precum şi 33 de tabele.

Meritul autorilor este cu atît mai mare, cu cît datele de biochimie funcţională existente în literatura mondială sînt dispersate în diferite reviste şi cărţi, uneori greu accesibile. Reunind materialul, sintetizîndu-l, interpretîndu-l, clasificîndu-l, în sfîrşit prezentîndu-l într-o formă accesibilă, cartea autorilor bulgari poate fi considerată printre primele tratate de biochimie funcţională.

Cartea se adresează cercetătorilor ştiinţifici, biochimiştilor, biofizicienilor, medicilor de specialităţi diferite, precum şi aspiranţilor şi studenţilor, tuturor celor care studiază bazele moleculare ale biologiei. Trebuie totuşi să menţionăm că, aşa cum subliniază şi autorii în prefaţă, cartea poate fi înţeleasă numai de cititorii care au cunoştinţe de chimie, biologie, şi în special de biochimie. Acestea sînt necesare, deoarece în carte nu au fost repetate probleme ce se găsesc în cursuri universitare ori în tratate.

Analizînd amploarea dată de autori diferitelor capitole, se remarcă în economia cărţii o inegală extindere a capitolelor. Acest lucru este justificat pe deplin de constatarea că, biochimia funcţională fiind o ramură tînără a biologiei moleculare, diferitele ei domenii sînt dezvoltate inegal.

Ar mai fi de menţionat lipsa, la sfîrşitul acestei valoroase lucrări, a unui index de subiecte, care ar fi uşurat folosirea şi valorificarea deplină a materialului cuprins în ea.

Bazele biochimiei funcţionale apărută la Sofia sub redacţia lui Asen A. Hadjiolov îndeplineşte cerinţele unui tratat modern, fiind pas la punct cu ultimele cuceriri ale ştiinţei în acest domeniu. Apariţia acestei cărţi completează în mod fericit seria de lucrări de biochimie apărute în ţara soră Bulgaria, dovedindu-ne şi pe această cale progresele acestei discipline.

Corneliu Medeşan
Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R. Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

MŰSZAKI KÖNYVTÁR 1383

1965 MAJ 29

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală**, partea I. **Fitochimie**, vol. I, 1964, 747 p., 41 lei.

I. HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 1960, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI, I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 1960, 96 p., 3,65 lei.

C. C. OPRESCU, **Infecţia cu micobacterii**, 1963, 224 p. +5 pl., 12,20 lei.

R. PORTOCALĂ şi N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie**, 1962, 180 p., 9,90 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 1961, 429 p., 22,80 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN şi N. CARP, **Histochimia şi fiziopatologia mucopolizaharidelor**, 1963, 284 p. + 2 pl., 20 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 8, NR 1, P. 1 — 124, BUCUREŞTI, FEBRUARIE 1965

I. P. „Informaţia" — c. 83

43816

Lei 12.—

II. 1330

studii și cercetări de biochimie

2

TOMUL 8
1965

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÂNE
St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 2, p. 125—250, București, mai 1965

MTA TÖRTÉNETTUDOMÁNYI DOKUMENTÁCIÓS ÉS MÓDSZERTANI KÖNYVTÁRA 1883

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei R. P. R.; M. MEZINCESCU, I. VASILESCU, TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacţie:

CECILIA ŞELARIU

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţu unui abonament anual este de 48 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134–135, Bucureşti, R.P. Română, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie"

ADRESA REDACŢIEI:

Bucureşti, *Str. Docenţilor nr. 20*
Raionul 30 Decembrie

MAGYAR ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1963

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 8 (1965) nr. 2

SUMAR

Pag.

I. MANTA, O. BÎRZU, V. BOTEZ, R. CĂTANĂ şi I. BODEA, Competiţia substraturilor pentru enzimele respiratorii ca factor de control a oxidărilor biologice 127

O. COSTĂCHEL, I. KIŢULESCU şi D. PASCU, Efectul grefei tumorale asupra variaţiilor mucoproteinelor serice la şobolani 137

A. ABRAHAM şi E. A. PORA, Acţiunea hormonilor sexuali asupra metabolismului acizilor nucleici şi al proteinelor din timus şi splină 141

V. ALEXANDRESCU, Comportarea electroforetică a proteinelor solubile din frunzele de porumb 151

G. ALGEORGE, EUG. PĂUNESCU şi M. STOIAN, Cercetări asupra relaţiilor dintre anticorpii antituberculofosfatid şi globulinele serice 155

I. BRAD, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota I. Studiul comparativ al conţinutului în vitamină C la cerealele de toamnă, în timpul iernii 163

M. CÂRSTEANU, Exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană normală 177

G. DINESCU şi A. CURIGUŢ, Interacţiunea citocromului *c* cu fosfolipidele tisulare 181

G. DINESCU şi P. TĂUTU, Acţiunea endoxanului asupra conţinutului în lipide a unor tumori experimentale 187

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU şi V. CALCANDI, Izolarea şi identificarea unor alcaloizi din *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack) Schinz et Kell 193

M. KEREKES şi P. FURDA, Acţiunea protectoare a unor glucide asupra denaturării prin căldură a tripsinei 199

I. KIŢULESCU, D. PASCU şi A. CURIGUŢ, Acţiunea histaminei şi tiaminpirofosfatului asupra nivelului mucoproteinelor serice, la şobolanii canceroşi 205

EUG. PĂUNESCU şi E. HADÎRCĂ-ILICA, Reactivitatea biochimică şi imunologică a macrofagului histioid. III. Activitatea fosfoesterazică 211

A. POPESCU şi M. CÂRSTEANU, Explorarea exocolului uterin prin exosmoza electroliţilor 221

A. SPORN şi I. DINU, Cercetări asupra respiraţiei celulare în intoxicaţia experimentală cu arsen 225

GR. TURCU, V. VASILESCU, A. CIUREŞ şi A. ST. ALBU, Studiu citochimic şi citospectrofotometric pe leucocitele şobolanilor iradiaţi intern cu ^{32}P. III. Utilizarea unui complex vitaminic ca radioprotector 235

RECENZIE 247

St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 2, p. 125 — 250, Bucureşti, mai 1965

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 127–135 (1965)

COMPETIȚIA SUBSTRATURILOR PENTRU ENZIMELE RESPIRATORII CA FACTOR DE CONTROL A OXIDĂRILOR BIOLOGICE *

I. MANTA, O. BÎRZU, VICTORIA BOTEZ, ROZALIA CĂTANĂ și ILEANA BODEA

577.15.025

Rezumat. — S-a studiat efectul diferiților intermediari din ciclul acizilor tricarboxilici, luați izolat sau în diferite asociații, asupra consumului de oxigen a omogenatelor de ficat. Creșterea consumului de oxigen nu depinde de natura substraturilor și nici de concentrația lor în limitele utilizate în experiențele noastre. Succinatul face excepție avînd un efect mai pronunțat și proporțional cu concentrația. Viteza de oxidare a unui substrat este limitată de produșii săi de transformare cu care intră în competiție. ADP mărește consumul de oxigen numai în prezența substratului exogen, efectul său fiind legat de o anumită concentrație limită.

Studiul acțiunii unor intermediari ai metabolismului asupra consumului de oxigen a dus la presupunerea că în celulă ar exista două tipuri de substrat : NAD-dependente (beta-hidroxibutiratul, piruvatul, alfa-cetoglutaratul, citratul, malatul) și FAD-dependente (în special succinatul). Această clasificare ridică problema valorii energetice a substraturilor ce aparțin unui grup și problema posibilității de compensare a tulburărilor implicate de inhibiția oxidării unuia dintre ele prin altul, a cărui oxidare nu este afectată. Coordonarea reacțiilor redox și de transfer al energiei se datorește unei varietăți de mecanisme : acțiunea maselor (cel mai vechi principiu de coordonare), activitatea enzimatică, prin limitarea nivelului reactanților (competiția pentru coenzime comune), capacitatea unor enzime de a fi activate sau inhibate prin cofactori specifici și, în sfîrșit, un mecanism specific, legat de organizarea structurală a metabolismului în mitocondrii [4].

Lucrarea de față încearcă să stabilească unele puncte de reper în aprecierea fenomenului de competiție a substraturilor ca factor de reglare a vitezei reacțiilor de oxidoreducere celulară, precum și relația cu ceilalți factori de control, în primul rînd cu ADP și P_i.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 3 (1965), în limba engleză.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate pe omogenate de ficat provenite de la şobolani albi de laborator.

Prepararea omogenatelor. Imediat după sacrificarea animalelor prin decapitare, se îndepărtează ficatul, se răceşte la 0°C şi se spală cu o soluţie de zaharoză 0,25 M, la pH 7,4. Ţesutul se omogenizează în zaharoză 0,25 M cu aparatul Potter-Elvehjem, la 2000 r. p. m., timp de un minut, obţinîndu-se o suspensie finală 10%.

Consumul de oxigen al omogenatelor s-a determinat manometric. Mediul de incubare conţine 1 ml de omogenat 10%, tampon Tris 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, fosfat 10 mM, substrat (piruvat, succinat, alfa-cetoglutarat, malat, citrat) în concentraţii variabile, ADP în concentraţii variind între 0,025 şi 1 mM. Vasul central s-a echipat cu 0,2 ml KOH 20% şi rolă de hîrtie de filtru. S-a lucrat în prezenţă de aer, la temperatura de 25°C, durata experienţei fiind de 40 min.

Eliberarea de CO_2 s-a măsurat manometric, prin metoda indirectă, utilizîndu-se două probe în paralel, care se deosebesc numai prin faptul că una are KOH în cuva centrală, iar cealaltă este lipsită de KOH. La sfîrşitul măsurării consumului de oxigen şi al eliberării de CO_2 se adaugă în vasele Warburg 1 ml de acid tricloracetic 20% şi în filtrat se determină substraturile adăugate.

Dozarea substraturilor. Piruvatul s-a dozat prin condensare cu 2,4-dinitrofenilhidrazină, extracţie în toluen, apoi în carbonat, şi fotometrarea produsului colorat [1]. Alfa-cetoglutaratul se condensează cu 2,4-dinitrofenilhidrazină ; urmează o extracţie în n-butanol, apoi în carbonat [1]. Citratul s-a determinat prin oxidare cu permanganat de potasiu la tribromacetonă şi condensare cu tiouree [9]. Acidul glutamic s-a determinat prin tratare cu ninhidrină şi extracţie în alcool octilic [10]. Acidul oxalilacetic s-a dozat prin decarboxilare cu citrat de anilină, urmată de măsurarea acidului piruvic format [1].

REZULTATE

Efectul diferitelor concentraţii de substrat şi al diverselor lor asociaţii asupra consumului de oxigen şi eliberării de CO_2 este arătat în tabela nr. 1. Din rezultatele prezentate se constată următoarele : cu excepţia succinatului, creşterea concentraţiei substratului de la 0,63 mM la 10 mM nu produce variaţii notabile ale consumului de oxigen, în limita erorilor experimentale. Palierul de saturaţie nu este caracteristic unui substrat, excepţie făcînd piruvatul, unde efectul asupra consumului de oxigen este în general mai mic atît pe omogenate cît şi pe mitocondrii [5].

Producerea de CO_2 ne oferă însă informaţii asupra raportului dintre consumul de substrat exogen şi de substrat endogen. Pe măsură ce concentraţia substratului adăugat creşte, eliberarea de CO_2 creşte şi ea, aproape liniar, în special în cazul citratului şi alfa-cetoglutaratului (substraturi a căror oxidare este însoţită de decarboxilare). Viteza de consum a substraturilor ne arată că pentru efecte apropiate asupra consumului de oxigen avem cel mai redus consum pentru citrat, apoi pentru alfa-cetoglutarat şi piruvat.

Diferitele asociații de substraturi nu produc modificări în consumul de oxigen al omogenatelor față de omogenatele incubate cu un singur substrat, adică nu există o însumare a efectului de stimulare a respirației.

Tabela nr. 1

Consumul de O_2 și producția de CO_2 a omogenatelor de ficat în prezența intermediarilor ciclului tricarboxilic

Mediul de incubare conține (concentrație finală) : 1 ml de omogenat 10% în zaharoză 0,25 M, tampon Tris 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, substrat (în brațul lateral) în concentrații de la 0,63 la 10 mM. Volum final 2 ml. În cupa centrală 0,2 ml KOH 20%. Atmosferă aer. Temperatura 25°, timp de determinare 40 min. La sfîrșitul acestui interval se adaugă 1 ml de acid tricloracetic 20% și din filtrat se dozează substratul pentru aprecierea consumului. Rezultatele sînt exprimate în mμ moli/mg reziduu sec

Substrat	Concentrație	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Substr. cons.
fără	(23)*	145 ± 19**	77 ± 8,5	
piruvat	1,25 mM (11)	193 ± 16	119 ± 10	92 ± 12
,,	2,50 mM (11)	199 ± 33	149 ± 24	152 ± 36
,,	5,00 mM (11)	210 ± 20	163 ± 27	238 ± 18
alfa-cetoglutarat	0,63 mM (9)	248 ± 36	155 ± 20	50 ± 2
,,	1,25 mM (9)	241 ± 24	189 ± 37	97 ± 5
,,	2,50 mM (9)	262 ± 60	245 ± 26	186 ± 33
,,	5,00 mM (9)	280 ± 39	271 ± 20	281 ± 40
citrat	0,63 mM (9)	218 ± 16	—	39 ± 5
,,	1,25 mM (9)	235 ± 29	195 ± 24	64 ± 8
,,	2,50 mM (9)	262 ± 42	225 ± 32	90 ± 28
,,	5,00 mM (9)	237 ± 28	283 ± 40	121 ± 28
succinat	0,63 mM (6)	184 ± 16	80 ± 13	
,,	1,25 mM (10)	204 ± 20	74 ± 15	
,,	2,50 mM (10)	242 ± 18	39 ± 8	
,,	5,00 mM (10)	303 ± 35	23 ± 10	
,,	10,00 mM (10)	332 ± 18		
malat	5,00 mM (6)	214 ± 21		
piruvat + citrat	,, (5)	277 ± 68		107 ± 16 75 ± 9
piruvat + succinat	,, (5)	326 ± 25		110 ± 19
citrat + alfa-cetoglutarat	,, (6)	280 ± 43		63 ± 12 132 ± 21
citrat + succinat	,, (6)	315 ± 28		54 ± 8
citrat + malat	,, (6)	265 ± 34		68 ± 14
alfa-cetoglutarat + succinat	,, (5)	325 ± 27		137 ± 20
alfa-cetoglutarat + malat	,, (5)	252 ± 31		175 ± 13

* În paranteze este indicat numărul de experiențe pentru fiecare variantă.
** Deviația standard (s).

Adăugarea de ADP în mediul de incubare determină o creștere apreciabilă a consumului de oxigen al omogenatelor în prezența substraturilor față de probele incubate numai cu substrat (tabela nr. 2). De notat că și în acest caz, în limita concentrațiilor utilizate, consumul de oxigen nu variază mult prin creșterea concentrației substraturilor. Lucrînd în concentrații variabile de ADP în prezența aceleiași cantități de substrat,

se constată că efectul ADP nu se manifestă decît la concentraţii mai mari de 0,1 mM, cînd se menţine constant, indiferent dacă mărim sau nu concentraţia de ADP.

În tabela nr. 3 sînt prezentate experienţele privitoare la efectul malonatului asupra consumului de oxigen al omogenatelor în prezenţa

Tabela nr. 2

Efectul ADP asupra consumului de O_2 şi vitezei de oxidare a substraturilor

Mediul de incubare şi condiţiile de experienţă sînt asemănătoare celor prezentate în tabela nr. 1; excepţia face adăugarea de ADP. Rezultatele sînt exprimate în mμ moli/mg reziduu sec

Substrat			ADP		Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Substrat cons.
—			0,5 mM	(8)*	155 ± 18**	—	—
piruvat	2,5	mM	,,	(5)	257 ± 25	188 ± 30	195 ± 17
piruvat	5	mM	,,	(5)	265 ± 30	—	—
piruvat	10	mM	,,	(5)	260 ± 33	—	—
citrat	2,5	mM	,,	(5)	353 ± 38	318 ± 32	105 ± 12
citrat	5	mM	,,	(5)	322 ± 16	347 ± 28	148 ± 16
alfa-ceto-glutarat	2,5	mM	,,	(6)	329 ± 20	282 ± 21	180 ± 23
alfa-ceto-glutarat	5	mM	,,	(6)	340 ± 45	340 ± 42	302 ± 41
piruvat	5	mM	0,025	(6)	205 ± 28		
piruvat	5	mM	0,050	(6)	190 ± 19		
piruvat	5	mM	0,100	(6)	247 ± 27		
piruvat	5	mM	0,250	(6)	242 ± 18		
piruvat	5	mM	0,500	(6)	265 ± 30		
piruvat	5	mM	1,000	(6)	252 ± 17		
succinat	10	mM	0,025	(5)	397 ± 28		
succinat	10	mM	0,050	(5)	417 ± 42		
succinat	10	mM	0,100	(5)	447 ± 60		
succinat	10	mM	0,250	(5)	512 ± 34		
succinat	10	mM	0,500	(5)	525 ± 28		
succinat	10	mM	1,000	(5)	505 ± 31		

* În paranteze este indicat numărul de experienţe pentru fiecare variantă.
** Deviaţie standard (s).

Tabela nr. 3

Efectul malonatului asupra consumului de O_2 şi consumului de citrat şi alfa-cetoglutarat

Mediul de incubare şi condiţiile de experienţă sînt asemănătoare celor prezentate în tabela nr. 1; excepţie face adăugarea de malonat 4 mM. Rezultatele sînt exprimate în mμ moli/mg reziduu sec

Substrat			Malonat	Q_{O_2}	Substrat consumat
fără			— (6)*	145 ± 19**	
fără			4 mM (6)	116 ± 14	
citrat	2,5	mM	— (6)	262 ± 43	90 ± 28
citrat	2,5	mM	4 mM (6)	211 ± 25	88 ± 19
alfa-cetoglutarat	2,5	mM	— (6)	245 ± 27	186 ± 33
alfa-cetoglutarat	2,5	mM	4 mM (6)	188 ± 17	179 ± 21
succinat	5	mM	— (10)	303 ± 35	
succinat	5	mM	4 mM (4)	143 ± 28	

* În paranteze este indicat numărul de experienţe pentru fiecare variantă.
** Deviaţie standard (s).

acidului citric și alfa-cetoglutaric. Malonatul la concentrația de 4 mM inhibă complet oxidarea succinatului, determinînd o scădere semnificativă a ratei respiratorii și în prezența acidului citric și alfa-cetoglutaric. În schimb, consumul acestor substraturi nu este cu nimic afectat.

Consumul în timp al citratului și alfa-cetoglutaratului, izolați sau în asociații în concentrații diferite, indică o cinetică aparentă de ordinul 1. În tabela nr. 4 sînt redate atît valorile de substrat găsite la diferite intervale de timp, cît și valorile constantei de viteză calculate din panta dreptei $ln \frac{X}{X_0} = - kt$, unde X este concentrația de substrat la un moment dat, X_0 concentrația inițială a substratului, iar k constanta de viteză. Deși pentru fiecare experiență legea exponențială de mai sus este verificată cu o foarte bună aproximație, constatăm că pentru același substrat k variază mult cu concentrația substratului. Consumul de oxigen nu se modifică mult dacă se lucrează la temperaturi între 25° și 37°C, în schimb constanta de viteză este foarte sensibilă la variații de temperatură. Din aceste motive, legea de mai sus, fără a fi riguros valabilă, în aceleași condiții de experiență ne servește la verificarea datelor experimentale. Pe de altă parte, în cazul unui lanț de reacții ea se verifică destul de bine pe baza aceleiași interpretări și pentru succesorii unui substrat din lanțul oxidărilor (de exemplu pentru alfa-cetoglutarat cu citrat). Din cauza acestor limitări, considerațiile noastre se reduc mai mult la aspectul calitativ al fenomenului decît la cel cantitativ.

DISCUȚII

Mecanismul competiției constituie unul dintre principalii factori de limitare a unei reacții sau a unui lanț de reacții enzimatice [3]. Modul în care putem aplica și urmări comportarea unui lanț de transformări în care un substrat poate intra în competiție cu succedaneii săi este însă departe de a fi atît de simplu pe cît se enunță în principiu.

Krebs [2], studiind competiția piruvatului și alfa-cetoglutaratului, arată că asociația acestor două substraturi nu are un efect aditiv asupra consumului de oxigen. Nu putem reduce însă competiția la procentul inhibițiilor reciproce ale componenților amestecului față de oxidarea substraturilor izolate. Astfel, lucrînd cu intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici, găsim că, în limite largi de concentrație, efectul asupra consumului de oxigen nu se modifică (succinatul face excepție), în schimb crește eliberarea de CO_2.

Faptul că pentru același efect asupra consumului de oxigen se consumă mult mai puțin citrat decît alfa-cetoglutarat arată că efectul citratului nu se datorește numai lui, ci și succesorilor săi din ciclul acizilor tricarboxilici. Într-adevăr, concentrația de alfa-cetoglutarat regăsită în mediul incubat cu citrat nu este echivalentă cu cantitatea de citrat consumată, ci se supune legii reacțiilor în lanț : A→B→C→ș.a.m.d. Acest fapt, contravine principiilor competiției care proclamă ca factor de dirijare

Tabela nr. 4

Consumul în timp al citratului şi alfa-cetoglutaratului

Mediul de reacţie conţine aceiaşi reactanţi ca şi cei indicaţi în tabela nr. 1. Volum final 10 ml. Temperatura de incubare 25°C. La intervale de 10 minute se iau 2 ml de mixtură şi se pipetează peste 1 ml de acid tricloracetic 20%. În filtrat se dozează ac. citric, ac. alfa-cetoglutaric şi ac. glutamic (pentru a urmări în ce măsură transaminarea acidului alfa-cetoglutaric influenţează consumul acestuia). Rezultatele sînt exprimate în mμ moli substrat regăsit/mg reziduu sec. În paranteze sînt indicate valorile de alfa-cetoglutarat formate în cazul incubării ţesutului cu citrat

Substanţa	Timpul						Ac. glutamic format în 40 min	k de viteză
	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min		
Citrat 1,25 mM								
Exp. 1	112 (1,9)	91 (3,8)	73 (5,7)	56 (9,1)	41 (11,0)	32 (8,5)	0,30	0,0248
Exp. 2	88 (2,3)	69 (2,7)	55 (4,2)	40 (6,0)	34 (8,3)	27 (10,0)	0,15	0,0236
Citrat 2,5 mM								
Exp. 1	210 (3,5)	169 (8,0)	135 (12,1)	104 (19,5)	79 (27)	61 (29)	0,27	0,0241
Exp. 2	181 (4,0)	147 (9,4)	120 (15,7)	108 (15,9)	82 (15,9)	68 (6,0)	0,19	0,0203
Alfa-cetoglutarat 1,25 mM								
Exp. 1	102	52	21	5	5	3	0,87	0,0693
Exp. 2	104	52	26	6	3	2	1,17	0,0685
Alfa-cetoglutarat 2,5 mM								
Exp. 1	215	152	108	72	45	38	1,93	0,0347
Exp. 2	258	201	139	108	79	65	2,06	0,0298
Exp. 3	202	130	106	73	41	28	5,10	0,0375

pentru oxidarea preferențială a unui substrat sau altuia concentrația sa și afinitatea pentru enzimele respiratorii (dată de valoarea lui k pentru reacția de oxidare a substratului respectiv), deoarece concentrația de alfa-cetoglutarat care se formează în intervalul de timp dat este foarte mică față de concentrația de citrat cu care el intră în competiție. Această observație se poate extinde și la alte reacții, unde ca prim factor de control intervine însăși concentrația limitată a enzimelor respiratorii. Fenomenul este ilustrat de experiența în care, alături de citrat și de alfa-cetoglutarat, am adăugat mediului malonat (tabela nr. 3).

În cazul asociației citrat-malonat, consumul de oxigen scade față de probele incubate cu citrat, deși oxidarea citratului nu este cu nimic afectată. Deoarece concentrația citratului era suficient de mare pentru a menține singur consumul de oxigen la valoarea palierului de saturație, era de așteptat ca malonatul să nu inhibe consumul de oxigen. Același rezultat l-am obținut prin utilizarea alfa-cetoglutaratului.

Faptele găsite ne arată că nu putem considera efectul unui substrat asupra consumului de oxigen ca fiind datorit exclusiv acestuia, ci și produșilor săi de oxidare, așa cum nu putem considera valorile cîtului de fosforilare în prezența unui substrat ca fiind datorite exclusiv acestuia, cu excepția cazurilor în care substratul rezultat din cel inițial nu mai suferă transformări oxidative (cazul acidului beta-hidroxibutiric).

Din discuția acestor rezultate se impune întrebarea cînd putem vorbi de o leziune biochimică enzimatică a lanțului respirator, dat fiind că studiul influenței substraturilor asupra consumului de oxigen al mitocondriilor, omogenatelor totale sau secțiunilor de țesut este adeseori utilizat pentru precizarea acestor leziuni. Astfel, se cunoaște în cancer o inhibiție a oxidării intermediarilor ciclului acizilor tricarboxilici, deși respirația în absența oricărui substrat este aceeași la țesuturile normale și tumorale [11]. Adăugarea de cofactori (NAD) normalizează rezultatele în cazul țesuturilor tumorale. Rezultate asemănătoare s-au obținut lucrînd pe omogenate de creier provenite de la iepuri martori și cu ateromatoză experimentală [5] [6]. Deși în absența oricărei substanțe exogene consumul de oxigen este apropiat la cele două loturi de animale, efectul piruvatului și succinatului este inegal, fapt care ne-a dus la presupunerea existenței unui blocaj în lanțul respirator al țesutului cerebral la iepurii cu ateromatoză experimentală. Adăugarea în mediul de incubare de ADP și NAD aduce valorile consumului de oxigen în prezența piruvatului și succinatului la nivelul celor întîlnite la țesutul normal. Reluînd experiențele pe mitocondrii de creier, cele două loturi prezentau aceleași valori ale consumului de oxigen în prezența piruvatului și succinatului și valori apropiate ale cîtului de fosforilare, ceea ce indică perturbarea factorilor de control ai lanțului respirator în ateromatoză și nu o leziune enzimatică propriu-zisă (6). Precizarea acestor fenomene este importantă, deoarece în primul caz posibilitatea de reversiune a fenomenului patologic este mai mare. Din aceste două exemple se poate constata variabilitatea rezultatelor în funcție de condițiile de experiență, ceea ce impune necesitatea efectuării cît mai multor experiențe de control, cu atît mai mult cu

cît nici una dintre variantele experimentale nu reproduce condiţiile iniţiale din ţesut, iar procesele fizice sau chimice la care sînt supuse celulele, ca şi oferta de substrat şi cofactori, ne îndepărtează de realitatea din celulă.

În ceea ce priveşte efectul ADP constatat în experienţele noastre, ne vom referi la un singur aspect. De la anumite concentraţii „prag" de ADP, efectul acestuia rămîne acelaşi dacă creştem concentraţia. Între valorile la care efectul ADP este manifest (concentraţia 0,1 mM) şi valorile consumului de oxigen la concentraţii de ADP mai mici decît 0,1 mM există o diferenţă semnificativă, adică, întocmai ca în cazul substraturilor, nici aici efectul nu este aditiv faţă de concentraţie. Asemenea salturi le-am constatat şi în cazul utilizării asociaţiilor fosfat-ADP, fosfat-substrat, fosfat-ADP-substrat, ceea ce ne arată că variaţia acestor parametri nu este însoţită de o variaţie continuă a consumului de oxigen, ci de variaţii bruşte. Între anumite limite ale acestor parametri variaţiile consumului de oxigen sînt „cuantificate". De aceea criteriile pe care le utilizăm în cazul reacţiilor chimice obişnuite nu sînt suficiente pentru reacţiile celulare. Ilustrăm cele spuse mai sus cu experienţele lui Slater, efectuate pe mitocondrii din inimă de bou [8]. Adăugarea de ADP mediului măreşte consumul de oxigen pînă la completa fosforilare la ATP, cînd panta dreptei revine la valorile de la începutul experienţei (în absenţa ADP). Studiile făcute asupra mecanismului fosforilării oxidative [7], [15] arată că fosforilarea ADP este consecinţa unui şir de reacţii în care sînt implicaţi ADP, fosfatul anorganic, substratul şi factorul de cuplare. Deoarece reacţiile sînt de echilibru, concentraţia de ADP joacă un rol important în dirijarea lor. Aşadar, prin reducerea concentraţiei de ADP ar fi normal ca valorile consumului de oxigen să revină treptat la cele iniţiale, şi nu brusc, cum se întîmplă în experienţă. Este posibil ca şi eroarea metodei să nu permită observarea acestor fenomene.

CONCLUZII

1. Substraturile NAD dependente determină o creştere a consumului de oxigen al omogenatelor de ficat de şobolan. În limitele de concentraţii utilizate, această creştere nu depinde de concentraţia şi de natura substratului. Succinatul se comportă diferit : prin creşterea concentraţiei lui în mediul de incubare, consumul de oxigen creşte. Este o dovadă că etapa piridinică a lanţului respirator reprezintă un factor principal de limitare a consumului de oxigen.

2. Adăugarea la omogenate de asociaţii de substraturi nu modifică consumul de oxigen faţă de experienţele în care substraturile s-au adăugat izolat, adică nu există o însumare de efecte în privinţa naturii sau concentraţiei substratului.

3. Competiţia substraturilor pentru enzimele respiratorii se manifestă chiar în cazul unui singur substrat, deoarece produşii săi de oxidare intră în competiţie cu el.

4. ADP mărește consumul de oxigen numai în prezența substratului exogen, iar efectul său este înregistrat numai la o anumită concentrație limită.

Catedra de biochimie, I.M.F., Cluj

Prezentată la redacție la 13 februarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Friedemann T. E., Haugen G. E., *Pyruvic acid. II. The determination of keto-acids in blood and urine*, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
2. Haslam J., Krebs H. A., *Substrate competition in the respiration of animal tissues. The metabolic interactions of pyruvate and α-oxoglutarate in rat liver homogenates*, Biochem. J., **86**, 432 (1963).
3. Hess B., *Fliessgleichgewichte der Zellen*, Deutch. Med. Wschr., **88**, 668 (1963).
4. Klingenberg M., *Coordination of hydrogen and energy transfer*, Sixth Int. Congress of Biochem., New-York, 1964, Abstracts IX, p. 699.
5. Manta I., Bedeleanu D., Bîrzu O., *Cercetări asupra unor leziuni biochimice în ateromatoza experimentală*, Comunicare la Conferința națională de farmacie, 14—16 nov. 1963.
6. Manta I., Bedeleanu D., Mureșan L., Gorun V., Bîrzu O., Bodea I., *Biochimia ateromatozei. Nota VI. Asupra unor modificări enzimatice legate de metabolismul energetic al țesutului cerebral în ateromatoza experimentală*, Clujul Medical, *3*, 132 (1964).
7. Racher E., Monroy G., *Coupling factors at the three sites of oxidative phosphorylation*, Sixth Int. Congress of Biochem., New York, 1964, Abstracts X, p. 760.
8. Slater E. C., Hülsmann W. C., *Control of rate of intracellular respiration*, Ciba Found. Sympos. on the Regulation of Cell Metabolism, Ed. Churchill, Londra, 1959, p. 58.
9. Stern J. R., *Methods in enzymology*, Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc. Publ., New York, 1957, v. III, p. 427.
10. Waelsch H., *Idem*, p. 570.
11. Wenner C. E., Weinhouse S., *Oxidative patways in tumour cells*, Cancer Res., **13**, 21 (1953).
12. Webster G., *The site specific coupling factors of mitochondrial oxidative phosphorylation*, Sixth Int. Congress of Biochem., New York, 1964, Abstracts X, p. 764.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 137–140 (1965)

EFECTUL GREFEI TUMORALE ASUPRA VARIAȚIILOR MUCOPROTEINELOR SERICE LA ȘOBOLANI *

O. COSTĂCHEL, I. KIȚULESCU și D. PASCU

616 — 006.6 — 092.9 : 616.15396 — 07

Rezumat. — În scopul de a surprinde anumite caractere ale mucoproteinelor serice care să diferențieze procesul de cancerizare de alte diverse agresiuni, s-au comparat între ele efectele produse în timp (patru zile), asupra mucoproteinelor serice, prin următoarele agresiuni făcute șobolanilor: grefarea tumorii izologe Jensen la șobolani nerezistenți față de tumoare, grefarea tumorii Jensen la șobolani făcuți rezistenți față de tumoare, grefarea unei tumori eterologe și o agresiune nespecifică (introducerea sub piele a unei bile de sticlă). Se constată că organismul diferențiază fiecare dintre agresiunile cercetate. Aceste diferențieri sînt exprimate prin creșterile maxime ale cantității mucoproteinelor serice, prin ritmul de apariție al acestor creșteri și prin raportul zahăr/proteină (Z/P) din molecula mucoproteinelor.

La animale nerezistente, grefa de tumoare izologă Jensen produce creșterea maximă a mucoproteinelor serice la 48 de ore de la grefare, această creștere fiind de 360%. Celelalte agresiuni cercetate determină variații cantitative mai mici ale mucoproteinelor serice, cu valori maxime la 24 de ore după agresiune. Cea mai mică variație cantitativă a mucoproteinelor serice este determinată de introducerea sub piele a bilei de sticlă, care provoacă o creștere maximă a mucoproteinelor serice, de 150%.

Diferențierile produse de raportul Z/P între mucoproteinele determinate de cei patru factori sugerează corelația între aceste rapoarte și gradul diferit de antigenicitate al diverselor mucoproteine.

Nivelul crescut al mucoproteinelor serice la canceroși este cunoscut de mult timp. Constatat încă din 1943 de Winzler și Burk, el făcuse obiectul unor cercetări mai vechi, centrate pe comportarea polarografică deosebită a serului canceros, pusă în evidență de Brdicka în 1933 și 1937 și explicată de Winzler pe baza componentelor mucoproteinice ale serului.

Interesul acestor observații s-a menținut în continuare și persistă și astăzi, cu toate că specificitatea acestei creșteri pentru boala canceroasă a fost combătută prin rezultate care au semnalat o creștere similară a mucoproteinelor serice în tuberculoză, reumatism, diferite infecții etc.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 2 (1965) în limba engleză.

Faptul că nivelul crescut al mucoproteinelor serice reprezintă un răspuns al organismului la diverse agresiuni [1] a ridicat problema locului unde se sintetizează aceste mucoproteine și a specificității acestor sinteze în legătură cu agentul determinant.

Cercetările în legătură cu sinteza mucoproteinelor în organismul în curs de cancerizare, ca și în cel cancerizat, se încadrează în problemele de specificitate a sintezei proteice, astfel încît ele sînt cuprinse de studiul caracterelor metabolice proprii organismului canceros.

Lucrarea de față caută să se axeze pe această direcție. În ea s-a încercat să se stabilească unele diferențe între efectul pe care grefa tumorală izologă îl determină asupra nivelului mucoproteinelor serice, comparativ cu o grefă tumorală izologă la animale rezistente față de aceasta și cu grefa tumorală eterologă în raport cu o agresiune nespecifică, luată drept martor și reprezentată de incizia pielii și introducerea sub piele a unei bile de sticlă.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-au utilizat în experiență 5 loturi de șobolani albi, rasa Wistar, de aproximativ 100 g.

Lotul I conținea 25 de șobolani grefați cu cîte un fragment de aproximativ 200 mg tumoare Jensen (tumoare izologă).

Lotul II conținea 20 de șobolani cărora li s-a creat în Institutul oncologic din București rezistența față de tumoarea Jensen. Trei grefe succesive de tumoare Jensen care nu au prins au dovedit această rezistență. După o lună de la ultima grefă, acest lot a fost grefat cu tumoare Jensen în mod similar cu primul.

Lotul III conținea 25 de șobolani grefați fiecare cu cîte un fragment de aproximativ 200 mg tumoare H 10 de hamster (tumoare eterologă).

Lotul IV conținea 25 de șobolani cărora li s-a introdus sub piele o bilă de sticlă sterilizată, de mărimea fragmentelor tumorale grefate. El formează primul lot martor.

Lotul V constituie al doilea lot martor, format din 25 de animale netratate (timpul 0 al experienței).

Din fiecare lot s-au sacrificat cîte 5 șobolani, la 2 ore după grefă, și apoi la perioade de cîte 24 de ore, timp de 4 zile.

Dozarea mucoproteinelor serice s-a făcut individual pentru serul fiecărui șobolan. S-a utilizat metoda dată de Winzler [2].

Proteina s-a dozat prin tehnica Lowry [3], iar galactoza-manoza prin reacția cu orcină [2].

Concentrația mucoproteinelor serice obținute în diverse condiții ale experienței s-a exprimat în mg de proteină a mucoproteinelor din 100 ml de ser. Galactoza-manoza mucoproteinelor s-a dozat pentru stabilirea raportului dintre zahărul și proteina mucoproteinei serice (z/p).

REZULTATE

Rezultatele sînt consemnate în figura 1. Ele demonstrează că organismul diferențiază fiecare din țesuturile grefate.

Din determinările de mucoproteine serice efectuate în cursul intervalului de 4 zile, în cadrul celor patru variante experimentale amintite,

se constată că nivelul cel mai ridicat al concentrației acestor mucoproteine este atins în cazul răspunsului față de grefa tumorală izologă (tumoarea Jensen), care prinde și se dezvoltă. *La 48 de ore* de la grefă, media valorilor mucoproteinelor determinate de grefa tumorii Jensen la șobolani nerezistenți este de 140 mg %, ceea ce reprezintă o creștere de 360% față de normal.

Imediat după aceasta se situează creșterea dată de grefa de tumoare Jensen la animale izologe făcute rezistente față de tumoare. *La 24 de ore* de la grefă, cînd se atinge valoarea maximă a creșterii mucoproteinelor serice, aceasta depășește cu 320% valorile normale, fiind în medie de 130 mg %.

La distanță de aceste două maxime se situează cele ale lotului cu eterografă și de agresiunea nespecifică (incizie + bila de sticlă), ambele vîrfuri apărînd *la 24 de ore după agresiune*. Heterografa a determinat valori ale mucoproteinelor serice cu o creștere maximă cu 200% în medie față de normal (90 mg %), iar bila de sticlă a determinat o creștere maximă de 150%, adică 75 mg% mucoproteine serice.

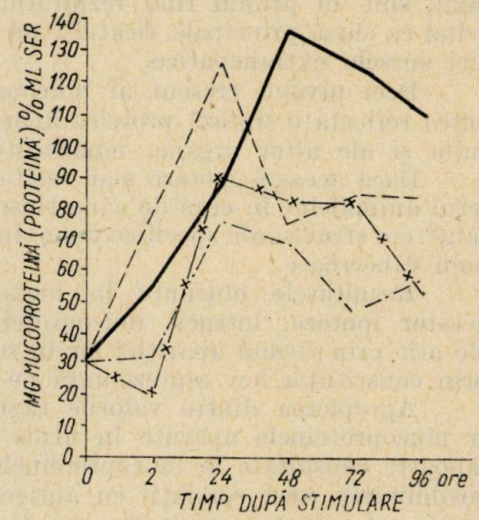


Fig. 1. — Efectul diverselor grefe tumorale asupra variațiilor mucoproteinelor serice la șobolani.
——— Grefă tumorală izologă (Jensen) la șobolani nerezistenți
– – – – Grefă tumorală izologă (Jensen) la șobolani rezistenți
×—×—× Eterografă
·—·—·—· Incizie și introducerea bilei de sticlă.

În privința perioadei la care apar aceste maxime, se remarcă diferențierea efectului produs de grefa tumorală izologă la șobolanii nerezistenți față de ea. Aceasta produce nivelul cel mai înalt al mucoproteinelor serice după 48 de ore de la grefare, pe cînd celelalte grefe determină concentrația maximă a mucoproteinelor serice după 24 de ore.

Se constată diferențierea efectelor produse de cei patru factori stimulatori și prin constituția mucoproteinelor apărute în ser reprezentată de raportul dintre zahărul și proteina moleculei lor.

Considerînd perioada dintre 48 și 96 de ore de la agresiune, se constată că agresiunea martor (incizie + bilă de sticlă) produce mucoproteine cu raportul cel mai scăzut (în medie 0,30), adică cel mai apropiat de raportul mucoproteinelor serice normale, care este 0,25. Asemănător acestuia este raportul care reprezintă constituția mucoproteinelor serice determinate de grefa tumorală izologă la șobolanii nerezistenți (0,33), pe cînd grefa tumorală eterologă și grefa tumorală izologă la șobolanii rezistenți față de ea produc mucoproteine al căror raport zahăr/proteină este mai mare, anume 0,50 (eterografă) și 0,56 (grefa tumorală izologă) la șobolanii rezistenți.

DISCUȚII

Numeroase cercetări [4] [5] au stabilit că modificările cantitative apărute la proteinele serice în diverse condiții anormale se datoresc în primul rînd activității hepatice.

Kukral și colab. [4] au demonstrat că și mucoproteinele serice sînt sintetizate în ficat, iar Chandler și Neuhaus [1] au adus dovezi că mucoproteinele apărute în cantitate mare în ser, ca răspuns la diverse agresiuni, sînt în primul rînd rezultatul unei activități sintetice crescute, avînd ca sursă principală ficatul : nu sînt excluse însă în această sinteză nici sursele extrahepatice.

Deci nivelul crescut al mucoproteinelor din serul canceroșilor ar putea reflecta o sinteză proteică anormală, datorită unor funcții ale ficatului și ale altor organe, modificate de boala canceroasă.

Dacă această ipoteză s-ar verifica, ar rezulta că mucoproteinele din serul animalelor în curs de cancerizare sau cancerizate pot avea anumite caractere structurale specifice unor sinteze proteice proprii metabolismului bolii canceroase.

Rezultatele obținute în lucrarea de față pledează în favoarea acestor ipoteze, întrucît mucoproteinele studiate se diferențiază între ele atît prin ritmul apariției lor în ser cît și prin cantitatea lor, și chiar prin constituția lor, reprezentată de raportul dintre hexoză și proteină.

Apropierea dintre valorile rapoartelor hexoză/proteină constatate la mucoproteinele apărute în urma grefei tumorale și valorile acestor rapoarte constatate la mucoproteinele existente normal în ser sugerează posibilitatea unei corelații cu antigenicitatea mucoproteinelor. În acest caz, aceste rapoarte ar indica o antigenicitate scăzută a mucoproteinelor apărute în ser în urma grefei tumorale.

Indiferent de gradul de specificitate al mucoproteinelor apărute în ser în urma celor patru agresiuni cercetate, diferența dintre aceste mucoproteine demonstrează capacitatea organismului de a răspunde selectiv față de solicitări diferite.

Laboratorul de enzimologie, Institul oncologic, București

Prezentată la redacție la 12 ianuarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. A. M. Chandler, O. W. Neuhaus, *Synthesis of serum glicoproteins in response to injury*, Am. J. Physiol., **206**, 169 (1964).
2. R. J. Winzler, *Methods of biochemical analysis*, Edit. D. Glick, vol. 2, 1955, p. 279.
3. O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. L. Farr, R. T. Randall, *Protein mesurement with the Folin phenol reagent*, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
4. I. C. Kukral, I. Sporn, I. Louch, R. T. Winzler, *Synthesis of alpha and beta globulins in normal and liverless dog*, Am. J. Physiol., **204**, 262 (1963).
5. E. Nettelbladt, L. Sundblad, *Formation of acid glicoprotein in serum*, Proc. exptl. Biol. Med., **102**, 225 (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 141–149 (1965)

ACȚIUNEA HORMONILOR SEXUALI ASUPRA METABOLISMULUI ACIZILOR NUCLEICI ȘI AL PROTEINELOR DIN TIMUS ȘI SPLINĂ*

ALEXANDRU ABRAHAM și ACADEMICIAN E. A. PORA

615.3 = 2 : 547.6

Rezumat. — Propionatul de testosteron, androsteronul, dehidroepiandrosteronul, benzoatul de 17-β-estradiol și progesteronul acționează asupra metabolismului acizilor dezoxiribo- și ribonucleici și al proteinelor, precum și asupra greutății relative a timusului și splinei. După administrarea hormonilor sexuali, concentrația acestor substanțe scade paralel cu scăderea greutății relative a timusului.

Acțiunea propionatului de testosteron este proporțională cu doza administrată. La splină se pot observa fenomene asemănătoare, dar variația greutății relative a splinei este diferită de cea a timusului.

În momentul de față hormonii sexuali sînt considerați că intervin aproape în toate funcțiile organismelor animale, dar modul lor de acțiune este încă foarte puțin cunoscut [1–5].

Kochakian [2] precizează că anumite țesuturi se dezvoltă mai rapid sau mai încet, iar altele, ca timusul, splina și glandele suprarenale, chiar se atrofiază sub acțiunea lor. Faptul că involuția timusului are loc o dată cu începerea dezvoltării glandelor sexuale presupune o legătură indiscutabilă între timus și gonade. Henderson, în 1904 (citat după [9]), a arătat pentru prima dată, că involuția timusului întîrzie la animalele castrate.

Rolul deosebit al hormonilor sexuali în declanșarea și accentuarea involuției timusului a fost studiat experimental de Selye [6], Oarhon și colab. [7–8], Comșa [9] Shibata, [10], Dorfman și colab. [11], Kochakian și colab. [12], precum și de noi [13–18].

Rezultatele acestor cercetări arată că prezența hormonilor sexuali în organism determină o serie de modificări morfohistologice, însoțite și de anumite modificări ale proceselor biochimice. Acest fapt ne-a determinat să studiem variația cantitativă a acizilor nucleici și a proteinelor totale din timusul și splina șobolanilor albi, după tratament *in vivo* cu hormoni sexuali.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **2**, 2 (1965), în limba engleză.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe şobolani albi de 100±10 g. Masculii au fost trataţi cu propionat de testosteron (C. I. F.), cu androsteron (androstan-3α-ol-17-on, sau cu dehidroepiandrosteron (Δ^5 -androsten-3β-ol-17-on Serva), iar femelele cu benzoat de 17β-estradiol (pur. Fluka) sau cu progesteron (p. a. Syntex). Substanţele au fost administrate intramuscular, timp de 3 zile, sub formă de suspensie uleioasă. Martorii au primit un volum egal de ulei vegetal sterilizat. După tratament, animalele au fost sacrificate prin decapitare.

Organele au fost prelevate şi spălate cu apă distilată, apoi cîntărite la balanţa de torsiune. Omogenizarea a fost făcută cu un aparat de sticlă tip Potter-Elvehjem, în acid percloric 0,2 N. Separarea acizilor nucleici s-a realizat după metoda lui Ogur şi Rosen [19], iar dozarea lor după metoda spectrofotometrică diferenţială a lui Spirin [20]. Deoarece acidul dezoxiribonucleic (ADN) în timus este în cantitate mult mai ridicată decît acidul ribonucleic (ARN), dozarea acestora s-a făcut prin determinarea concentraţiei acizilor nucleici totali şi a ADN din acelaşi organ, concentraţia ARN obţinîndu-se prin diferenţă. Astfel s-au evitat erorile care, eventual, ar fi survenit din cauza concentraţiilor mai reduse de ARN. Citirea s-a efectuat cu ajutorul unui spectrofotometru K. Zeiss, V. S. U.-1. Soluţia etalon a fost preparată din ADN (pur., E. Nickel).

Dozarea proteinelor totale s-a făcut după metoda Robinson şi Hogben, modificată de Korpaczy [19]. Probele au fost citite la fotocolorimetrul F. E. K.-N 57, cu filtrul nr. 1 (360 mμ). Soluţia etalon a fost preparată din insulină cristalizată (C. I. F.).

REZULTATE

A) *Acţiunea hormonilor androgeni.* Determinînd variaţia concentraţiei de ADN, ARN şi proteine, precum şi greutatea relativă a timusului după administrarea de propionat de testosteron (PTS), de androsteron (ADS) şi de dehidroepiandrosteron (DHA), am găsit că, dintre aceşti hormoni, cel mai puternic efect îl manifestă PTS. În ordinea puterii de acţiune, urmează ADS şi apoi DHA. Puterea acţiunii timolitice a PTS este într-o oarecare măsură proporţională cu doza administrată (tabela nr. 1). Reducerea greutăţii relative a timusului la dozele de 25 şi 50 mg PTS (pentru fiecare 10 g de greutate vie) este însoţită de o scădere semnificativă a concentraţiei de ADN. Scăderea concentraţiei de ARN şi a proteinelor nu este semnificativă decît la doza de 50 mg. Creşterea raportului ARN/ADN în funcţie de doza administrată arată că degradarea ADN este mai intensă decît cea a ARN.

Studiind paralel modificările din splină, rezultatele obţinute arată că şi la nivelul acestui organ concentraţia ADN scade proporţional cu doza de PTS administrată, la fel şi concentraţia de ARN, dar cea a proteinelor şi greutatea relativă a organului nu se modifică semnificativ faţă de martor (tabela nr. 2).

ADS şi DHA administrate în doza de 25 mg au, la această doză, o potenţialitate mai mică decît PTS (tabela nr. 3). Reducerea greutăţii relative a timusului la administrarea ADS este egală cu 34,2%, iar la DHA cu 17,4% faţă de martor. Variaţia concentraţiei proteinelor, ADN, ARN (în cazul DHA) şi raportul ARN/ADN nu sînt semnificative.

Tabela nr. 1

Variația cantității acizilor nucleici și a proteinelor din timus după administrarea propionatului de testosteron

DOZA mg/100 g		ADN mg/g	ARN mg/g	ARN/ADN	PROTEINE mg/g	GREUT. ORGAN. mg/g
0	$\bar{X}$	17,160	5,663	0,29	138,9	1,61
	E.S.	±0,738	± 0,459	± 0,02	±13,7	± 0,08
	n	8	8	7	6	8
10	$\bar{X}$	15,963	4,996	0,27	113,9	1,26
	E.S.	± 0,761	± 0,563	± 0,03	± 8,0	± 0,06
	n	6	6	5	6	6
	P	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,01
	D%	− 7,0	−11,8	− 7,3	−18,0	−21,8
25	$\bar{X}$	14,178	5,232	0,36	111,9	0,90
	E.S.	± 0,629	± 0,438	± 0,04	± 7,4	± 0,03
	n	8	8	8	6	8
	P	< 0,01	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,01
	D%	−17,4	− 7,7	+24,1	−19,5	−44,1
50	$\bar{X}$	11,544	4,416	0,38	101,1	0,82
	E.S.	± 0,332	± 0,456	± 0,04	± 6,1	± 0,04
	n	6	6	6	6	6
	P	< 0,01	~ 0,05	> 0,02 < 0,05	> 0,02 < 0,05	< 0,01
	D%	−32,7	−22,1	+31,0	−27,3	−49,1

Tabela nr. 2

Variația cantității acizilor nucleici și a proteinelor din splină după administrarea propionatului de testosteron

DOZA mg/100 g		ADN mg/g	ARN mg/g	ARN/ADN	PROTEINE mg/g	GREUT. ORGAN. mg/g
0	$\bar{X}$	8,721	6,302	0,73	174,1	3,98
	E.S.	± 0,600	± 0,349	± 0,06	±17,5	± 0,35
	n	8	7	7	6	7
10	$\bar{X}$	6,432	5,180	0,80	157,1	3,96
	E.S.	± 0,340	± 0,448	± 0,07	± 9,4	± 0,31
	n	6	6	6	6	6
	P	< 0,01	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	D%	−26,3	−17,8	+ 9,6	− 9,8	− 0,6
25	$\bar{X}$	5,379	5,080	0,92	178,0	4,46
	E.S.	± 0,280	± 0,346	± 0,04	±11,9	± 0,27
	n	7	7	7	6	8
	P	< 0,01	> 0,01 < 0,02	< 0,01	> 0,05	> 0,05
	D%	−38,4	−19,4	+26,1	+ 2,9	+12,0
50	$\bar{X}$	4,613	4,825	1,10	134,0	4,06
	E.S.	± 0,600	± 0,397	± 0,09	±11,7	± 0,22
	n	6	6 > 0,01	6	6	6
	P	< 0,01	< 0,02	< 0,01	~ 0,05	> 0,05
	D%	−47,2	−23,5	+50,4	−23,1	+ 2,0

Tabela nr. 3

Variaţia cantităţii acizilor nucleici şi a proteinelor din timus şi splină după administrarea androsteronului şi a dehidroepiandrosteronului (doza totală: 25 mg pe 100 g greutatea vie)

ORGANUL			ADN mg/g	ARN mg/g	ARN/ADN	PROTEINE mg/g	GREUT. ORGAN. mg/g
TIMUS	M	$\bar{X}$	17,160	5,663	0,29	138,9	1,61
		E.S.	± 0,738	± 0,459	± 0,02	±13,7	± 0,08
		n	8	8	7	6	8
	ADS	$\bar{X}$	15,655	4,481	0,32	120,4	1,06
		E.S.	± 0,523	± 0,335	± 0,04	± 5,5	± 0,18
		n	8	8	8	6	8
		P	> 0,05	~ 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,01
		D%	− 8,8	− 20,9	+ 9,4	−13,4	−34,2
	DHA	$\bar{X}$	16,418	5,817	0,36	134,6	1,33
		E.S.	± 0,429	± 0,541	± 0,06	±10,0	± 0,12
		n	5	6	6	6	6
		P	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	~ 0,05
		D%	− 4,4	+ 2,7	+27,6	− 3,1	−17,4
SPLINĂ	M	$\bar{X}$	8,721	6,302	0,73	174,1	3,98
		E.S.	± 0,600	± 0,349	± 0,06	±17,5	± 0,35
		n	8	7	7	6	7
	ADS	$\bar{X}$	7,476	5,263	0,71	178,0	4,08
		E.S.	± 0,600	± 0,436	± 0,11	±10,2	± 0,28
		n	8	8	8	6	7
		P	> 0,02 < 0,05	~ 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
		D%	−14,3	−16,5	− 2,8	+ 2,2	+ 2,5
	DHA	$\bar{X}$	5,566	4,158	0,85	154,0	5,13
		E.S.	± 1,024	± 0,266	± 0,10	± 9,3	± 0,21
		n	6	6	6	6	6
		P	~ 0,05	> 0,02 < 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,01 < 0,02
		D%	−36,2	−34,1	+16,4	−11,6	+28,8

Totodată, din tabela nr. 3 se poate vedea că rezultatele găsite la splină nu urmează totdeauna variaţiile obţinute la timus. Astfel, scăderea concentraţiei acizilor nucleici sau a proteinelor (deşi nu totdeauna semnificativă) nu este însoţită de o reducere a greutăţii relative a organului.

B) *Acţiunea hormonilor feminini.* Benzoatul de *17* β-estradiol (BED), administrat în doza de 25 mg pe 100 g greutate vie, determină o scădere semnificativă a concentraţiei ADN şi ARN din timus, dar în acelaşi timp raportul ARN/ADN creşte cu 34,2%. Greutatea relativă a timusului nu arată variaţii semnificative, ceea ce a fost constatat şi de Dorfman şi Dorfman [11] la şoareci trataţi zilnic cu 25—250 μg sau 2 mg estradiol.

Sub acţiunea BED, concentraţia ADN şi a ARN scade semnificativ la nivelul splinei, variaţia celorlalţi indici nu este însă semnificativă.

Tabela nr. 4

Variația cantității acizilor nucleici și a proteinelor din timus și splină după administrarea hormonilor sexuali feminini (doza totală: 25 mg pe 100 g greutate vie)

ORGANUL			ADN mg/g	ARN mg/g	ARN/ADN	PROTEINE mg/g	GREUT. ORGAN. mg/g
TIMUS	M	$\bar{X}$	18,612	6,539	0,35	138,7	1,62
		E.S.	± 0,953	± 0,279	± 0,03	± 7,2	± 0,02
		n	8	8	8	6	8
	BED	$\bar{X}$	11,614	4,990	0,47	121,3	1,51
		E.S.	± 0,548	± 0,509	± 0,09	± 2,9	± 0,07
		n	6	5	6	6	6
		P	< 0,01	< 0,01	> 0,05	> 0,02	> 0,05
		D%	−37,6	−23,7	+34,2	< 0,05	− 6,8
						−12,6	
	PRG	$\bar{X}$	16,444	5,144	0,33	118,8	1,19
		E.S.	± 0,400	± 0,492	± 0,04	± 7,7	± 0,06
		n	8	8	8	6	8
		P	> 0,02	> 0,02	> 0,05	> 0,05	< 0,01
			< 0,05	< 0,05			
		D%	−11,7	−21,4	− 5,8	−14,4	−26,6
SPLINĂ	M	$\bar{X}$	10,296	8,022	0,80	181,8	4,61
		E.S.	± 0,629	± 0,604	± 0,10	± 8,5	± 0,33
		n	7	7	7	7	7
	BED	$\bar{X}$	7,692	7,008	0,90	164,1	5,26
		E.S.	± 0,551	0,815	± 0,15	±10,4	± 0,43
		n	6	6	6	6	6
		P	< 0,01	< 0,01	> 0,05	> 0,05	> 0,05
		D%	−25,3	−12,5	+12,5	− 9,8	+14,0
	PRG	$\bar{X}$	8,513	6,104	0,71	160,3	4,44
		E.S.	± 0,564	± 0,726	± 0,07	± 8,5	±0,43
		n	8	8	8	7	8
		P	~ 0,05	~ 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
		D%	−17,4	−24,0	−11,3	−11,9	− 3,7

După administrarea a 25 mg de progesteron (PRG) pe 100 g greutate vie, concentrația ARN, scade cu 21,4%, a ADN cu 11,7%, iar aceea a proteinelor cu 14,4% (P 0,05). În același timp greutatea timusului scade semnificativ cu 26,6%. La splină variația greutății nu este semnificativă, dar scade semnificativ concentrația ARN (cu 24,0%) și a ADN (cu 17,4%). Concentrația proteinelor scade nesemnificativ (tabela nr. 4).

C) *Compararea acțiunii hormonilor sexuali masculini și feminini.* În figura 1 se poate vedea că toți hormonii sexuali, în dozele utilizate de noi, au efect timolitic, care se manifestă prin reducerea greutății relative a organului, cu scăderea concomitentă a cantității acizilor nucleici și a proteinelor.

În ceea ce priveşte modificările obţinute la splină, se poate vedea că, deşi concentraţia acizilor nucleici scade, greutatea relativă a organului ori rămîne constantă, ori creşte uşor (numai în cazul dehidroepiandrosteronului creşterea este semnificativă).

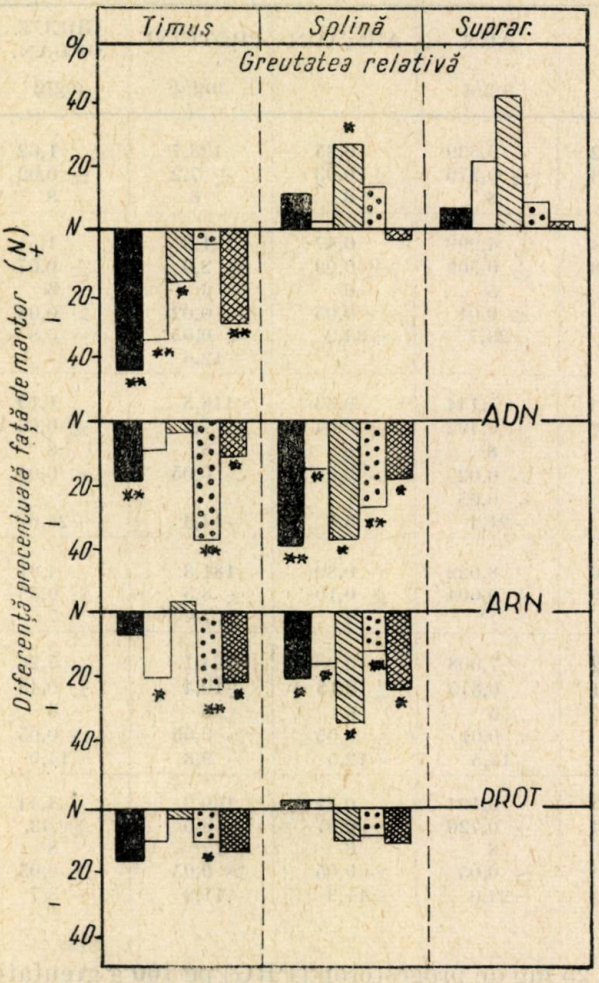


Fig. 1. — Variaţia procentuală (± %) faţă de valoarea normală (N) a greutăţii relative a timusului, splinei şi a glandelor suprarenale, precum şi a concentraţiei de ADN, ARN şi a proteinelor din timus şi splină după administrarea de 25 mg PTS ( ), ADS ( ), DHA ( ), BED ( ) sau PRG ( ) pe 100 g greutate vie. ** $P < 0{,}01$; * $0{,}05 > P > 0{,}02$.

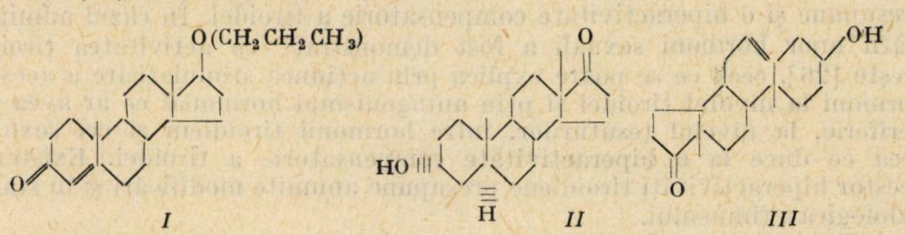
Deoarece semnele de hipertrofie a glandelor suprarenale după tratament cu estradiol au fost observate de mai mulţi autori [21], [17], constatîndu-se intensificarea încorporării metioninei-S^{35} în proteinele acestei glande, am urmărit în experienţele noastre şi variaţia greutăţii relative a acestor glande. După administrarea de DHA şi ADS, greutatea relativă a suprarenalelor creşte semnificativ faţă de martor, iar în cazul BED şi PTS ea creşte uşor. Sub acţiunea progesteronului nu am găsit variaţii semnificative (fig. 1).

DISCUŢII

Rezultatele noastre arată că timusul, splina şi glandele suprarenale reacţionează fiecare în mod specific faţă de diferiţi hormoni sexuali, cinetica metabolismului acizilor nucleici şi a proteinelor suferind anumite modificări. La timus, sub acţiunea acestor hormoni echilibrul se deplasează în mod evident spre catabolismul substanţelor sus menţionate.

Din experienţele noastre rezultă că, la hormonii masculini cercetaţi, ordinea activităţii timolitice corespunde cu ordinea potenţialităţii andro-

gene. Astfel, în această ordine primul este PTS (*I*), după el urmează ADS (*II*) și DHA (*III*).



I *II* *III*

Acțiunea metabolică a acestor hormoni încă nu se cunoaște cu exactitate, mai ales că ei acționează diferit la nivelul diferitelor țesuturi. După Silverman și colab. [22], acțiunea metabolică a testosteronului s-ar realiza prin stimularea activității ribozomilor din organele sexuale accesorii, în procesul sintezelor proteice. DHA este secretat în cantități considerabile de glandele suprarenale și, după Tsutsui și colab. [24], ar avea un efect inhibitor asupra *6*-fosfogluco-dehidrogenazei, avînd un rol regulator asupra metabolismului glucidic la mamifere.

Estradiolul și progesteronul arată o potențialitate timolitică remarcabilă. Pe baza rezultatelor publicate anterior [13—18], precum și a celor din lucrarea prezentată, se poate considera că acești hormoni, fie direct, fie indirect, modifică profund procesele metabolice ale proteinelor, aminoacizilor și acizilor nucleici din timus. Acțiunea lor metabolică se manifestă în general prin stimularea proceselor anabolice. Așa, de exemplu, Greenman și Kenney [23] presupun că estradiolul ar fi un stimulator al sintezei proteice. Acești autori au dovedit că încorporarea aminoacizilor la nivelul ribozomilor din țesutul uterin este dependentă de acest estrogen. Însă nu se știe dacă această acțiune a estradiolului se menține și la nivelul celorlalte țesuturi, deoarece nici uterul nu reacționează în același fel la administrarea estrogenilor, endometrul avînd o capacitate de reținere mai mare a estrogenilor comparativ cu miometrul.

Despre modul de acțiune al progesteronului știm și mai puțin, acțiunea timolitică a acestuia manifestîndu-se numai la dozele mari [13]. După Dorfman și Dorfman [11], acțiunea progesteronului și testosteronului s-ar realiza prin inhibarea metabolismului oxidativ din timus. Din datele noastre anterioare, precum și din literatură, reiese că acțiunea timolitică a hormonilor steroizi, care conțin sistemul Δ^4-*3*-ceto, crește cu numărul funcțiilor hidroxilice sau cetonice prezente în molecula lor [16], [18], [28]. Astfel, hidrocortizonul și cortizonul sînt cei mai puternici timolitici, corticosteronul, *11*-dezoxicorticosteronul și progesteronul fiind slab timolitici. Interesant este faptul că testosteronul se încadrează între cei mai puternici timolitici.

Prezența unor doze excesive de hormoni în organism nu poate să rămînă fără răsunet asupra celorlalte glande endocrine. De aceea pentru elucidarea mecanismului de acțiune al hormonilor sexuali asupra timusului trebuie să ținem seama de interrelația ce există între timus și celelalte glande endocrine și limfatice. Comșa susține [25] că acțiunea unor hormoni

sexuali ar avea loc prin intermediul tiroidei. Într-adevăr, în afară de corelaţiile anterohipofizo-gonadiene şi suprarenalo-gonadiene, se poate presupune şi o hiperactivitate compensatorie a tiroidei. În cazul administrării unor hormoni sexuali a fost demonstrat că activitatea tiroidei creşte [26], ceea ce se poate explica prin acţiunea stimulatoare a acestor hormoni la nivelul tiroidei şi prin antagonismul hormonal ce ar avea loc periferic, la nivelul ţesuturilor, între hormonii tiroidieni şi cei sexuali, ceea ce duce la o hiperactivitate compensatorie a tiroidei. Existenţa acestor hiperactivităţi tiroidiene presupune anumite modificări şi în starea fiziologică a timusului.

Din numeroasele date experimentale reiese că administrarea estrogenilor determină o hipertrofie suprarenală, însoţită de semnele hiperactivităţii: creşterea metabolizării fosforului, scăderea colesterolului şi a acidului ascorbic [21] şi intensificarea încorporării metioninei-S^{35} în proteinele suprarenale [17]. Stimularea activităţii suprarenale se realizează, probabil, prin intermediul axei hipofizare, dată fiind inhibarea sintezei colesterolului din ficat de către estrogen. Colesterolul sanguin constituie un precursor elementar de primă importanţă pentru elaborarea steroizilor suprarenali. ACTH-ul are o acţiune de stimulare a sintezei colesterolului din ficat. Această intervenţie în sens antagonic a estrogenilor şi ACTH-ului asupra elaborării hepatice de colesterol a făcut pe unii autori să distingă două faze în acţiunea estrogenilor pe suprarenală: într-o primă fază blocarea sintezei de colesterol prin estrogeni produce un efect de inhibiţie a suprarenalei. Această inhibiţie stimulează la rîndul său secreţia de ACTH care activează suprarenala nu numai prin stimularea cunoscută a steroidogenezei, dar şi prin creşterea sintezei de colesterol hepatic [21]. Prin urmare, creşterea activităţii glandelor suprarenale presupune că mărirea secreţiei hormonilor corticosuprarenali care au o acţiune timolitică puternică [11], [27—29].

Rezultatele noastre arată că, după administrarea testosteronului şi a progesteronului, greutatea relativă a suprarenalelor nu variază semnificativ. Încorporarea metioninei-S^{35} în proteinele suprarenale scade cu 9,3% după administrarea de testosteron [17]. Sub acţiunea androsteronului şi a dehidroepiandrosteronului greutatea relativă a suprarenalelor creşte, ceea ce presupune o legătură între acţiunea lor timolitică şi acest fenomen.

Academia R.P.R., Filiala Cluj,
Secţia de fiziologie animală

Prezentată la redacţie la 6 ianuarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. A. Lupulescu, *Hormonii steroizi*, Edit. medicală, Bucureşti, 1958.
2. C. A. Villee, L. L. Engel, *Mechanism of action of steroid hormones*, Pergamon Press, Oxford-Londra-New York, 1961, p. 155.
3. H. Tesseraux, *Physiologie und Pathologie der Thymus*, Edit. J. Barth, Leipzig, 1959.
4. G. Cseh, I. Marosváry, A. Harmath, *Effect of corticosteroids on desoxyribonuclease in lymphoid organs*, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., XIV, **115** (1958).

5. Y. J. Beauviex, *Apports expérimentaux à la physiologie du thymus*, Presse méd., **71**, 1 367 (1963).
6. H. Selye, *Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications*, Brit. J. exp. Path., **XVII**, 234 (1936).
7. C. I. Parhon, *Opere alese*, vol. III, Edit. Acad. R.P.R., 1959.
8. C. I. Parhon et al., *Modificări în structura testiculului la șobolani cu și fără timus, purtători de tumori transplantate*, St. cerc. endocrinal, **6**, 355 (1955).
9. I. Comșa, *Wechselwirkungen zwischen dem Thymus und anderen inkretorischen Drüsen*, Ann. Univ. Saaraviensis. Med., **IV**, 213 (1963).
10. K. Shibata, *Experimental studies on the thymus. IV. Interrelation between the thymus and gonads*, Gunma J. Mez. (Japonia), **IV**, 55 (1955).
11. R. L. Dorfman, A. S. Dorfman, *The relativ thymolitic activities of corticoids using the ovariectomized-adrenalectomized mouse*, Endocrinology, **69**, 283 (1961).
12. C. D. Kochakian, G. H. Harrison, *Regulation of nucleic acid synthesis by androgens*, Endocrinology, **70**, 99 (1962).
13. A. A. Pora, A. Abraham, V. Toma, N. Șildan, *Acțiunea progesteronei asupra cantității acizilor nucleici din timus și splină la șobolanii albi*, Comunic. Acad. R.P.R., **XIII**, 977 (1963).
14. E. A. Pora, A. Abraham, V. Toma, *Action de la progestérone sur l'involution du thymus*, J. Physiol, **35**, 320 (1963).
15. E. A. Pora, A. Abraham, V. Toma, *Acțiunea progesteronei asupra încorporării fosfatului anorganic-P^{32}, a metioninei-S^{35} și asupra metabolismului proteic din timus și splină*, St. cerc. biol. (seria : Zool.) **XVI**, 3 (1964).
16. E. A. Pora, A. Abraham, N. Șildan, *Acțiunea derivaților progesteronei asupra acizilor nucleici din timus și splină*, St. cerc. biochim., **7**, 155 (1964).
17. E. A. Pora, A. Abraham, V. Toma, *Influența hormonilor sexuali asupra înglobării metioninei-S^{35} în proteinele din timus*, St. cerc. biol. (sub tipar, 1964).
18. A. Abraham, E. A. Pora, N. Șildan, *Studiul spectrofotometric al extractului de timus la șobolani tratați cu diferite steroide*. St. cerc. biol., **XVI**, 411 (1964).
19. A. Kovách, *A kisèrletes orvostudomàny vizsgàlo modszerei*, Bp. Akad. Kiado, vol. II și vol. IV, 1958.
20. А. К. СПуРуН, Спектрофотометрическое опредение суммарного количества нуклеиновых кислот, Биохимия, **32**, 656 (1958).
21. I. Milcu, *Acțiunea farmacodinamică a estrogenilor*, St. cerc. endocrinol., **XIV**, 157 (1963).
22. D. A. Silverman, S. Liao, H. G. Williams-Ashman, *Influence of testosterone and polyuridylic acid on the incorporation of phenylalanine into peptide linkage by prostatic ribosomes*, Nature, **199**, 808 (1963).
23. D. L. Greenman, F. T. Kenney, *Effects of alterations in hormonal status on ribosomes of rat uterus*, Arch. Biochem. Biophys, **107**, 1 (1964).
24. E. A. Tsutsui, P. A. Marks, P. Reich, *Effect of dehydroepiandrosterone on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and reduced triphosphopyridine nucleotide formation in adrenal tissue*, J. Biol. Chem. **237**, 3009 (1962).
25. I. Comsa, A. A. Bezsonoff, *Einfluss der Wechselwirkung Schilddrüsse Gonaden auf den Funktionszustand des Thymus*, Pflüger's Archiv ges. Physiol. Dtsch., **269**, 361 (1959).
26. B. A. Eskin, M. B. Dratman, M. D. Pettit, *The influence of ovarian hormones on goitrogenesis*, Endocrinology, **69**, 195 (1961).
27. E. A. Pora, V. Toma, I. Oros, A. Abraham, *Биохимические измения при инволюции вилочковой железы*, Rev. biol., **1**, 129 (1962).
28. N. R. Stephenson, *The effect of corticosteroid analogues on the thymus gland of the immature rat*, J. Pharmacol., **12**, 411 (1960).
29. J. Ringler, J. Haynes, *Relationship of thymolytic and glycogenic activities of adrenocorticoids*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **111**, 606 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 151–154 (1965)

COMPORTAREA ELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR SOLUBILE DIN FRUNZELE DE PORUMB *

VICTORIA ALEXANDRESCU

581.19

Rezumat — Proteinele solubile din frunzele de porumb (*Zea mays*), varietatea indentata, soiul ICAR-54, se separă prin electroforeză pe hîrtie în trei fracţiuni, în diferite sisteme tampon. Fracţiunile proteice obţinute prezintă mobilităţi mai mari în raport cu cele ale proteinelor extrase din germenul şi endospermul seminţei de porumb ca atare sau încolţită. Aceasta arată că în cursul dezvoltării ontogenetice a porumbului însuşirile proteinelor suferă modificări.

Metabolismul plantelor se modifică în diversele etape de creştere şi de dezvoltare a lor, în funcţie de cerinţele organismului, ceea ce, desigur, se reflectă în primul rînd în compoziţia în diferite proteine. Stabilirea comportării calitative a proteinelor din organismul plantelor în timpul creşterii şi dezvoltării acestora prezintă deci interes pentru biochimie.

În literatură există lucrări prin care sînt cercetate diferite proprietăţi ale proteinelor, cum ar fi : mobilitatea electroforetică, comportarea în procesul de salifiere şi desalifiere [1], [2], antigenitatea [3] etc., cu scopul de a se scoate în evidenţă diferenţieri şi asemănări în calitatea proteinelor solubile, de la un organ la altul sau în diverse etape de creştere şi de dezvoltare a plantei respective. Aceste cercetări arată că însuşirile proteinelor nu sînt aceleaşi la diferitele organe ale unei plante sau la aceleaşi organe ale unor plante din specii diferite, precum şi că în cursul dezvoltării ontogenetice ele suferă modificări.

Mergînd pe această linie, Mertz şi colab. [4] au cercetat, prin electroforeză în mediul lichid, proteinele solubile din germenul şi endospermul bobului de porumb, iar noi, folosind electroforeza pe hîrtie, am stabilit comportarea proteinelor din germenul şi endospermul bobului de porumb ICAR-54 înainte şi după încolţire [5] [6], precum şi din germeni de porumb aparţinînd unor varietăţi diferite [7]. Tot prin electroforeză pe hîrtie, Maksiutin [8] a cercetat proteinele din sucul plantelor de porumb, soiul Harkov-dinte de cal şi hibridul VIR-25 pe parcursul întregii perioade de vegetaţie, în scopul de a cunoaşte compoziţia lor calitativă şi cantitativă.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim, 2, 2 (1965), în limba franceză.

constatînd în tot timpul vegetației prezența a trei fracțiuni proteice, aceleași în ambele cazuri, care suferă însă variații cantitative.

Scopul nostru de ansamblu este urmărirea comportării electroforetice a proteinelor solubile din porumb în dezvoltarea ontogenetică pentru a scoate în evidență calitatea lor, și de aceea a fost necesar să extindem cercetarea și asupra proteinelor solubile din frunzele de porumb în condiții de extracție și electroforeză asemănătoare celor în care s-a lucrat anterior [5] [6] [7].

În lucrarea de față s-a cercetat separarea proteinelor solubile din frunzele de porumb (*Zea mays*), varietatea indentata (*dentiformis*), soiul ICAR-54, în faza de plantă cu 4—5 frunze, cu ajutorul electroforezei pe hîrtie. Plantele de porumb au fost crescute atît în condiții de cîmp, cît și în condiții de seră.

Pentru prelucrare s-au luat frunzele 2, 3, 4 și, respectiv, 2, 3, 4 și 5. Extragerea proteinelor solubile din frunze s-a efectuat în principiu după metoda descrisă de Mertz și colab. [4]. Ca extractant s-a folosit soluția tampon acid boric-borax cu pH 8,2, în amestec cu soluție de clorură de sodiu 12,5 %(v/v). Frunzele (100 g) s-au trecut printr-o mașină de tocat, s-au amestecat cu extractant în proporție de 1 g material/0,5 ml de extractant și s-au înghețat și dezghețat de trei ori, pentru a se distruge membranele celulare, apoi s-au mojarat. După centrifugare, supernatantul s-a extras o singură dată cu butanol (o parte supernatant + două părți butanol). Extractul obținut s-a supus dializei față de apă distilată timp de 16 ore, pentru a se îndepărta urmele de butanol și o mare parte din săruri. Extractul s-a concentrat prin ultrafiltrare și apoi s-a liofilizat. Preparatul obținut conține aproximativ 10 % proteine. În vederea electroforezei, din liofilizat s-au preparat soluții apoase de 5 — 8 % proteină. Electroforeza proteinelor s-a efectuat în soluție tampon de acid succinic 0,026 M-hidroxid de sodiu $\approx$ 0,0448 M cu adaos de soluție de fosfat disodic M/30 în proporție de 200 ml de soluție tampon și 200 ml de soluție fosfat disodic; o putere de rezoluție bună a soluției tampon a fost găsită între pH 8,2 și 8,6 (tampon 1). Cu aceeași soluție s-a efectuat și electroforeza proteinelor din germenul și endospermul bobului de porumb ca atare sau germinat [5—7].

Pentru a vedea dacă prin separări electroforetice cu alte sisteme de soluții tampon se poate obține un alt număr de fracțiuni proteice, s-a lucrat cu soluții tampon de acid boric-borax, medinal-veronal (ca atare și cu adaos de soluție de fosfat disodic) și cu soluție tampon de fosfați în domeniul de pH 8,2—8,8. În toate aceste variante se separă același număr de fracțiuni proteice; separări nete s-au obținut însă în special cu soluția tampon de acid boric 0,02 M-borax 0,05 M, cu adaos de soluție de fosfat disodic M/30 în proporție de 2v/1 V, în domeniul de pH 8,6—8,8 (tampon 2).

Determinările s-au făcut pe hîrtie Whatman nr. 1, folosindu-se o cădere de potențial de 7 V/cm, timp de 2 ore, la o intensitate a curentului de 0,5 mA/cm.

Punerea în evidență a fracțiunilor proteice s-a făcut cu o soluție de albastru de bromfenol. Determinarea procentului fracțiunilor proteice separate s-a făcut prin metoda eluției, cu citirea extincțiilor la fotocolorimetrul FEK.

În figura 1 sînt redate, în paralel, electroforegramele obținute cu proteinele solubile din frunzele de porumb, pe de o parte prin separare electroforetică în soluție tampon de acid succinic-hidroxid de sodiu, cu adaos de soluție de fosfat disodic (electroforegrama A), pe de alta în soluție

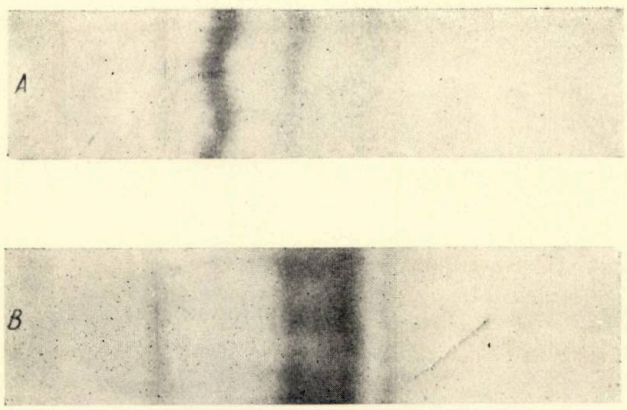


Fig. 1. — *Electroforegramele proteinelor solubile din frunzele de porumb, în faza de plantă cu 4 — 5 frunze.*

A, Electroforeza în soluție tampon de acid succinic-hidroxid de sodiu cu adaos de fosfat disodic.
B, Electroforeza în soluție tampon de acid boric-borax cu adaos de fosfat disodic.

tampon de acid boric-borax, cu adaos de soluție de fosfat disodic (electroforegrama B). În ambele cazuri se constată prezența a trei fracțiuni proteice.

Extractul proteic din frunze conține chinone care în timpul electroforezei se distribuie diferit pe electroforegramă, în funcție de taponul folosit. Astfel, în cazul tamponului 1 chinonele se întind pe toată electroforegrama (porțiunea cu fracțiunile proteice și încă 2—3 cm în partea frontală), pe cînd în cazul tamponului 2 chinonele migrează mai strîns în partea frontală a electroforegramei, în figură ele observîndu-se ca o a patra fracțiune, care se prelungește apoi mai slab pe aproximativ încă 1 cm.

Valorile procentuale relative și mobilitățile fracțiunilor proteice pentru electroforeza în soluția tampon 1 sînt redate în tabela nr. 1, iar cazul ectroforezei în soluția tampon 2, în tabela nr. 2.

Tabela nr. 1

Procentul relativ și mobilitatea fracțiunilor proteice solubile din frunzele de porumb în faza plantă cu 4—5 frunze pentru electroforeza în soluție tampon de acid succinic-hidroxid de sodiu cu adaos de fosfat disodic

Denumirea fracțiunilor	Fracțiuni de la start		
	1	a 2-a	a 3-a
Procentul relativ	31	34	35
Mobilitatea $\times 10^{-5}$ cm²/s/V	2,62	5,20	8,50

Tabela nr. 2

Procentul relativ și mobilitatea fracțiunilor proteice solubile din frunzele de porumb în faza plantă cu 4—5 frunze pentru electroforeza în soluție tampon de acid boric-borax cu adaos de fosfat disodic

Denumirea fracțiunilor	Fracțiuni de la start		
	1	a 2-a	a 3-a
Procentul relativ	19	38	43
Mobilitatea $\times 10^{-5}$ cm²/s/V	2,62	5,20	7,65

Din examinarea electroforegramelor și a datelor din tabele se constată că cantitatea de proteine din fiecare dintre cele trei fracțiuni obținute variază cu tamponul folosit pentru electroforeză. În ambele soluții tampon, fracțiunea cea mai mobilă prezintă mobilități diferite, pe cînd celelalte două au mobilități asemănătoare. În cazul soluției tampon 1, în partea frontală a electroforegramei se obține o zonă lată destul de slab colorată cu albastru de bromfenol, care însă conține o cantitate de 35% proteină (procent relativ), cu o mobilitate medie de $8{,}50 \cdot 10^{-5}$cm²/s/V. În cazul soluției tampon 2 folosite, fracțiunea a treia este reprezentată strîns și conține 45% proteină (procent relativ), cu o mobilitate de $7{,}65 \cdot 10^{-5}$cm²/s/V.

Comportarea electroforetică a proteinelor solubile extrase atît din plantele crescute în condiții de cîmp cît și în condiții de seră este asemănătoare.

Datele de mai sus, comparate cu valorile mobilității proteinelor din germenul bobului de porumb de același soi ICAR-54 obținute în condiții asemănătoare, arată că proteinele din frunze posedă o mobilitate electroforetică mai mare. Astfel, prima fracțiune de la start a proteinelor din frunze, care are mobilitatea egală cu $2{,}62.10^{-5}cm^2/s/V$, este apropiată din punctul de vedere al sarcinilor electrice pe care le conține de fracțiunea a patra, cea mai mobilă, a germenilor boabelor de porumb, care pentru soiul ICAR-54 este de $2{,}80.10^{-5}cm^2/s/V$. Celelalte două fracțiuni prezintă mobilități cu mult mai mari, și anume de 5, 20, respectiv $8{,}50.10^{-5}cm^2/s/V$.

În concluzie, putem arăta următoarele:

a) Electroforegramele proteinelor solubile din frunzele de porumb (*Zea mays*), varietatea indentata, soiul ICAR-54, prezintă același număr de fracțiuni (trei) în cele două soluții tampon folosite pentru electroforeză (acid succinic-hidroxid de sodiu cu adaos de fosfat disodic, pH 8,2—8,6, și acid boric-borax cu adaos de fosfat disodic, pH 8,6—8,8).

b) Cantitatea de proteine din fiecare fracțiune electroforetică variază în funcție de tamponul folosit pentru electroforeză.

c) În ambele soluții tampon fracțiunea cea mai mobilă prezintă mobilități diferite, pe cînd celelalte două fracțiuni au mobilități asemănătoare.

d) Fracțiunile proteinelor obținute din frunze prezintă o mobilitate mai mare decît fracțiunile proteinelor extrase din germenul și endospermul de porumb ca atare și încolțit. Aceasta arată că în cursul dezvoltării ontogenetice a porumbului însușirile proteinelor suferă modificări.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., București

Prezentată la redacție la 1 februarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Victor Gheție, *Cercetări asupra proteinelor din fasole* (Phaseolus vulgaris). *I. Caracterizarea proteinelor din sămînță*, St. cerc. biochim., **2**, 169 (1959).
2. Victor Gheție, *Cercetări asupra proteinelor din fasole* (Phaseolus vulgaris). *II. Modificarea proteinelor din sămînță în timpul germinației*, St. cerc. biochim., **2**, 293 (1959).
3. J. Kloz, V. Turkovà, E. Klozovà, *Serological investigation of taxonomic specificity of proteins in various plant organs in some taxons of the family Viciaceae*, Biol. Plantarum (Praga), **2**, 126 (1960).
4. E. T. Mertz, N. E. Lloyd, R. Bressani, *Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts*. Cereal Chem., **35**, 146 (1958).
5. Victoria Alexandrescu, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb*, St. cerc. biochim., **5**, 7 (1962).
6. Victoria Alexandrescu, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb în timpul încolțirii*, St. cerc. biochim., **5**, 399 (1962).
7. Victoria Alexandrescu, *Comportarea electroforetică a proteinelor solubile din germenii diferitelor soiuri de porumb*, St. cerc. biochim., **7**, 347 (1964).
8. G. V. Maksiutin, *Electroforeticeskoe issledovanie belkov v rasteniiah kukuruzi*, Trudî Harîkov. Selîskohoz. Inst., **19**, 69 (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 155–161 (1965)

CERCETĂRI ASUPRA RELAȚIILOR DINTRE ANTICORPII ANTITUBERCULOFOSFATID ȘI GLOBULINELE SERICE *

G. ALGEORGE, EUG. PĂUNESCU și MARIA STOIAN

Rezumat. — S-au cercetat relațiile dintre nivelul anticorpilor antifosfatid (care exprimă activitatea lezională în tuberculoză) și modificările în fracțiunile globulinice serice.

La 131 de bolnavi cu tuberculoză pulmonară activă (88 de cazuri) și stabilizată (43 de cazuri) s-a constatat un paralelism între media titrului anticorpilor antifosfatid și concentrația fracțiunii α_2-globulinice, diferența dintre loturi fiind statistic semnificativă.

Adsorbția serurilor de la bolnavii de tuberculoză cu antigenul micobacterian complex (corpi bacilari delipidați) duce la scăderea titrului antifosfatidic și a fracțiunilor α_2 și γ-globulinice.

Adsorbția realizată numai cu antigen fosfatidic determină, pe lîngă scăderea titrului anticorpilor antifosfatid, o reducere semnificativă numai a concentrației fracțiunii α_2-globulinice.

Adsorbția similară a serurilor provenite de la bolnavii cu afecțiuni netuberculoase nu modifică titrul anticorpilor, iar scăderea concentrației fracțiunilor globulinice este slabă și nediferențiată.

Aceste date constituie un argument în sprijinul ipotezei că anticorpii antifosfatid ar fi localizați în fracțiunea α_2-globulinică.

Procesele rezultate din interacțiunea parazit-gazdă în cursul infecției tuberculoase duc la dezintegrarea celulei bacteriene, urmată de eliberarea componentelor ce intră în structura bacilului tuberculozei. Printre acestea, cele cu calități antigenice constituie stimuli specifici, care, la nivelul sistemului reticulo-histiocitar, determină elaborarea unor anticorpi umorali: antituberculoproteină, antituberculopolizaharid, antituberculofosfatid etc.

Decelarea prezenței acestor anticorpi și evaluarea titrului lor au stat la baza unor tehnici pentru aprecierea infecției tuberculoase și a gradului de activitate a acesteia.

În acest sens au fost elaborate unele teste care să permită urmărirea evoluției diferitelor forme de tuberculoză, cum sînt testul de hemaglutinare

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **2**, 2 (1965), în limba engleză.

Middlebrook-Dubos (pentru anticorpii antituberculopolizaharid), testul cu hematii tanate-Boyden (pentru anticorpii antituberculoproteină) etc.

Aceste teste s-au dovedit a avea sensibilitate şi specificitate redusă, punînd în evidenţă, atunci cînd sînt pozitive, mai ales infecţia tuberculoasă şi mai puţin gravitatea acesteia.

Preocuparea de a găsi noi metode de investigaţie care să deceleze activitatea leziunilor tuberculoase a dus în ultima vreme la recomandarea unor noi teste de aglutinare pasivă, în care, spre deosebire de antigenele bacilare uzuale (tuberculopolizaharid şi tuberculoproteină), se întrebuinţează un antigen de natură lipidică-tuberculofosfatidul adsorbit pe particule inerte (kaolin). Cu ajutorul acestui test s-a constatat că prezenţa în ser a anticorpilor antifosfatidici peste o anumită concentraţie exprimă evolutivitatea leziunilor tuberculoase cu mai multă specificitate decît anticorpii antipolizaharidici şi antiprotidici [1], [2].

Pe de altă parte, studiile electroforetice ale fracţiunilor proteice din serul bolnavilor cu tuberculoză au arătat unele modificări particulare care constau în special în scăderea raportului albumine/globuline şi în creşterea fracţiunilor α_2-globulinice şi γ-globulinice [3—5]. Creşterea α_2-globulinelor a fost semnalată în special în cazurile de tuberculoză evolutivă, în timp ce creşterea γ-globulinelor a fost constatată, în general, în toate cazurile de infecţie tuberculoasă, indiferent de gravitatea acesteia.

După cum se cunoaşte, în general, în bolile infecţioase de origine bacteriană apariţia anticorpilor specifici este însoţită de unele modificări ale proteinelor serice, interesînd cu precădere fracţiunea γ-globulinică, separabilă electroforetic. Asemenea studii au permis localizarea anticorpilor bacterieni în această fracţiune.

Studii similare au fost efectuate şi în cazul infecţiei tuberculoase, iar rezultatele lor au arătat localizarea anticorpilor antituberculoproteină tot în fracţiunea γ-globulinică [4].

Pentru anticorpii determinaţi de fracţiunea antigenică tuberculolipidică, asemenea studii nu au fost însă efectuate.

În cercetarea noastră ne-am propus să abordăm problema localizării anticorpilor antituberculolipidici, folosind în acest scop tuberculofosfatidul.

Am pornit de la legătura dintre creşterea titrului antituberculofosfatid al serului bolnavilor cu tuberculoză evolutivă [1], [6], [7] şi creşterea concentraţiei fracţiunii α_2-globulinice [3], [4], [5], [7]. În acest sens, la un lot de bolnavi cu tuberculoză pulmonară am căutat să stabilim dacă există o corelaţie semnificativă între aceşti doi factori; totodată, am cercetat modificările nivelului anticorpilor antifosfatid şi al fracţiunilor globulinice, după supunerea acestor seruri la adsorbţia cu antigene micobacteriene.

MATERIALE ŞI METODE

Serurile au fost recoltate steril, pe nemîncate; nu s-au utilizat serurile cu hemoliză sau lipemice. Ele au provenit de la bolnavi cu tuberculoză pulmonară evolutivă sau stabilizată şi de la bolnavi cu alte afecţiuni la care reacţia de kaolinoaglutinare a fost pozitivă.

Seroreacția de kaolinoaglutinare cu antigen fosfatidic a fost efectuată conform tehnicii recomandate de Takahashi [2], utilizată și în laboratorul nostru [6], [7].

Adsorbția serurilor s-a obținut prin incubarea serului la 37° pe de o parte cu corpi bacterieni de *M. tuberculosis*, tulpina H_{37} Rv, delipidați cu acetonă (antigen complex), și pe de altă parte cu antigen tuberculofosfatidic (antigen monovalent) adsorbit pe kaolin; în acest ultim caz, adsorbția s-a efectuat în paralel și cu kaolin nesensibilizat (fără antigen), pentru aprecierea adsorbției nespecifice.

Pentru electroforeza în coloană de lichid s-au utilizat numai serurile adsorbite cu corpi bacilari, serul adsorbit cu kaolin fiind impropriu pentru aceasta, deoarece prezintă o turbiditate datorită prezenței particulelor de kaolin.

Electroforeza: s-a folosit tehnica pe hîrtie (Whatmann nr. 1, tampon veronal pH = 8,6, f. i. = 0,05, timp de migrare = 7 h) și microelectroforeza în coloană de lichid (Elektrophoresegerät E. 35,C. Zeiss, Jena).

REZULTATE

Corelația dintre nivelul anticorpilor antifosfatid și concentrația fracțiunii α_2-globulinice. Serurile provenite de la 131 de bolnavi de tuberculoză pulmonară în diferite stadii de evoluție au fost împărțite în două loturi, în funcție de titrul antifosfatid, pragul de 1/32 fiind considerat semnificativ pentru diagnosticul de activitate lezională [1], [2], [6], [7]. La aceste seruri s-a efectuat în paralel și electroforeza pe hîrtie. Rezultatele acestor investigații, redate în tabela nr. 1, se referă la titrul anticorpilor și la valorile fracțiunii α_2-globulinice.

Tabela nr.1

Rezultatele testării serologice și ale determinării α_2-globulinei

Lotul	Numărul cazurilor	Media reciprocei titrului	Media concentrației α_2-globulinei* (%)
Titrul antifosfatid sub 1/32	88	4,0	8,89 (±1,55)
Titrul antifosfatid egal sau mai mare decît 1/32	43	64,8	10,0 (±1,72)

* DM = 1,11; eD = ± 0,3; 3 eD<DM (diferența este semnificativă statistic)

Din tabela nr. 1 rezultă că serurile bolnavilor de tuberculoză pulmonară, care au titruri ridicate de anticorpi antifosfatid, prezintă în același timp și valori mai crescute ale fracțiunii α_2-globulinice; diferențele dintre mediile valorilor α_2-globulinei sînt statistic semnificative.

Efectul adsorbției cu antigene micobacteriene. Pentru cercetarea acțiunii adsorbției cu antigene de *M. tuberculosis* asupra titrului anticorpilor și nivelului diferitelor fracțiuni electroforetice din ser au fost utilizate 24 de seruri. În tabelele nr. 2—4 și în figurile 1 și 2 sînt redate cîteva

Tabela nr. 2

Tuberculoză pulmonară fibrocavitară, examen serologic și electroforetic înainte și după adsorbția cu corpi microbieni uscați și delipidați cu acetonă

Valori	Serul neadsorbit	Serul adsorbit	Modificări după adsorbție
Titrul kaolinoaglutinant	1/64	1/8	
Proteine totale (g la 100 ml de ser)	9,562	8,708	
Albumine	4,52 (47,1%)	4,49 (51,6%)	
α_1-globuline	0,988 (10,3%)	0,983 (11,3%)	—
α_2-globuline	1,902 (19,8%)	1,40 (16,1%)	— 26,7%
β-globuline	0,988 (10,3%)	0,914 (10,5%)	— 7,5%
γ-globuline	1,20 (12,5%)	0,914 (10,5%)	— 23,9%
Raport A/G	0,89	1,06	

exemplificări, din care rezultă efectul adsorbției asupra serurilor provenite de la bolnavi de tuberculoză și de la cazuri cu alte afecțiuni în care testul serologic a evidențiat un titru pozitiv semnificativ (> 32).

Din tabela nr. 2 rezultă că, după adsorbția cu corpi de *M. tuberculosis*, concentrația α_2-globulinelor și a γ-globulinelor prezintă scăderi importante (—26,7%, respectiv — 23,9%) față de α_1-globuline, care rămîn practic nemodificate, și față de β-globuline, care scad numai cu 7,5%.

Din tabela nr. 3 se observă că serul provenit de la un bolnav cu o afecțiune netuberculoasă, după adsorbția cu corpi microbieni, nu prezintă

Tabela nr. 3

Bronșectazie și ciroză hepatică: examen serologic și electroforetic înainte și după adsorbția cu corpi microbieni uscați și delipidați cu acetonă

Valori	Serul neadsorbit	Serul adsorbit	Modificări după adsorbție
Titrul kaolinoaglutinant	1/128	1/128	
Proteine totale(g la 100 ml de ser)	6,336	6,120	
Albumine	2,83 (45%)	2,9 (48,6%)	
α_1-globuline	0,69 (11%)	0,66 (10,8%)	—0,2%
α_2-globuline	0,88 (14%)	0,75 (12,2%)	—1,8%
β-globuline	0,69 (1%)	0,57 (9,5%)	—1,5%
γ-globuline	1,19 (19%)	1,15 (18,9%)	—0,1%
Raport A/G	0,8	0,9	

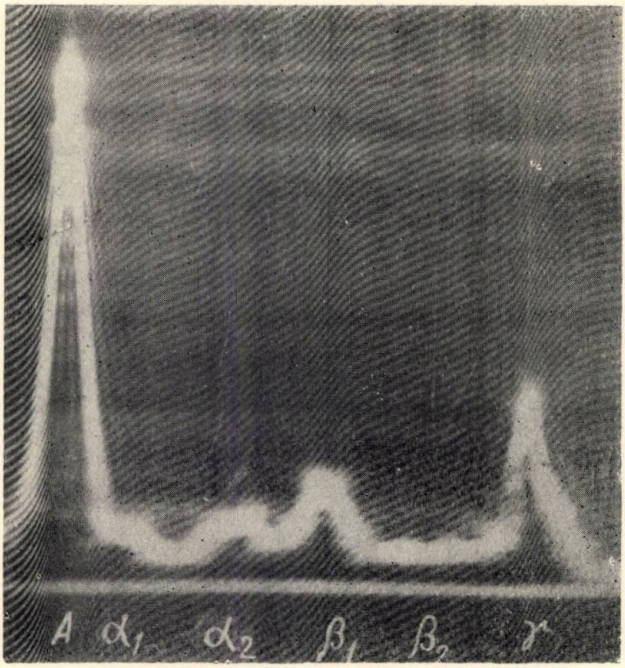


Fig. 1. — Aspectul electroforetic al unui ser neadsorbit provenit de la un bolnav cu tuberculoză pulmonară.

Fracţiunea	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
Concentraţia (%)	41,4	9,8	11,9	13,8	4,7	18,4
Conc. în g/100 ml	3,07	0,72	0,89	1,03	0,33	1,38

Proteine totale : 7,4 g/100 ml ser.

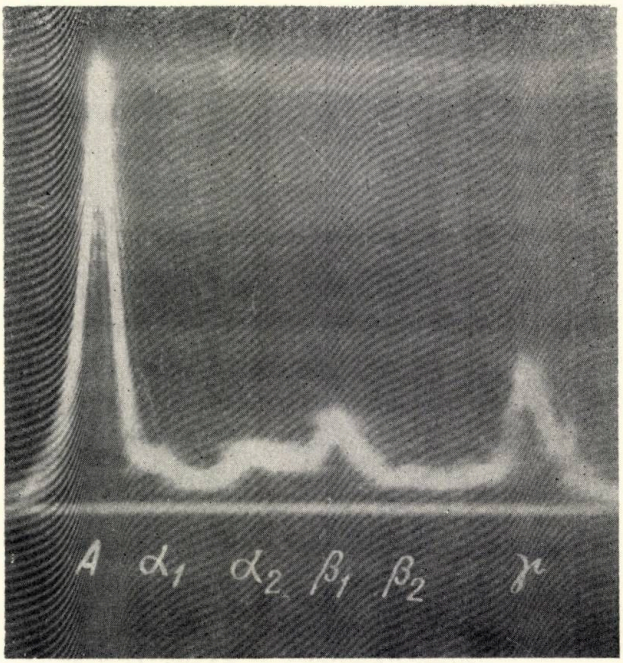


Fig. 2. — Aspectul electroforetic al serului provenit de la un bolnav cu tuberculoză pulmonară, după adsorbţie cu corpi bacilari parţial delipidaţi.

Fracţiunea	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
Concentraţia (%)	43,8	9,9	8,4	14,8	5,5	17,6
Conc. în g/100 ml	3,14	0,72	0,50	1,11	0,44	1,28

Proteine totale: 7,2 g/100 ml ser.

modificarea titrului kaolinoaglutinant, iar scăderea concentraţiei diferitelor fracţiuni serice este redusă, neinteresînd cu precădere o anumită fracţiune globulinică. Adsorbţia este deci nespecifică.

În figurile 1 şi 2 sînt redate două imagini ale curbelor de electroforeză în coloană de lichid, obţinute cu un ser provenit de la un bolnav de tuberculoză pulmonară, înainte şi după adsorbţia cu corpi microbieni. Din examinarea acestor figuri rezultă de asemenea că, după adsorbţie, cele mai importante scăderi ale concentraţiei globulinelor se realizează în fracţiunile α_2 şi γ.

În tabela nr. 4 sînt redate rezultatele examenelor serologic şi electroforetic ale unui ser provenit de la un bolnav de tuberculoză pulmonară, la care adsorbţia a fost efectuată numai cu antigen tuberculofosfatid,

Tabela nr. 4

Tuberculoză pulmonară fibrocavitară; examenul serologic şi electroforetic înainte şi după adsorbţia cu kaolin sensibilizat şi nesensibilizat

Valori	Serul neadsorbit (*SN*)	Serul adsorbit cu kaolin sensibilizat cu fosfatidă (*KF*)	Serul adsorbit cu kaolin nesensibilizat (*K*)	C_{SN}*	C_{KF}*	Coeficient* de adsorbţie nespecifică $C_{SN}-C_{KF}$
Titrul kaolino-aglutinant	1/64	1/8	1/64			
Proteine totale (g la 100 ml de ser)	9,625	5,24	4,38			
Albumine	4,52 (47,1 %)	2,79 (53,3 %)	2,19 (50 %)	0,927	1,05	Valori negative
α_1-globuline	0,988 (10,3 %)	0,45 (9,3 %)	0,4 (9,3 %)	1,11	0,92	0,09
α_2-globuline	1,902 (19,8 %)	0,73 (14 %)	0,525 (12 %)	1,62	0,92	0,66
β-globuline	0,988 (10,3 %)	0,71 (13,5 %)	0,486 (11,1 %)	0,913	1,22	Valori negative
γ-globuline	1,20 (12,5 %)	0,57 (10,9)	0,77 (17,6 %)	0,70	0,61	0,09

* Pentru estimarea adsorbţiei specifice (datorită antigenului fosfatidic), s-a aplicat atît valorilor serului normal, cît şi celui adsorbit cu fosfatidă, un coeficient de corecţie a adsorbţiei nespecifice, datorită kaolinului, după formulele:

$$C_{SN} = \frac{a_{SN}}{a_K} \times \frac{A_K}{A_{SN}}$$

$$C_{KF} = \frac{a_{KF}}{a_K} \times \frac{A_K}{A_{KF}}$$

în care: a_{SN} = concentraţia fracţiunii în serul neadsorbit
a_{KF} = " " " " " adsorbit cu kaolin sensibilizat
a_K = " " " " " adsorbit cu kaolin nesensibilizat
A_{SN} = " proteinelor în serul neadsorbit
A_{KF} = " " " " " adsorbit cu kaolin sensibilizat
A_K = " " " " " " " " " nesensibilizat

adsorbit pe particule de kaolin. Ţinînd seama de faptul că în acest caz se realizează o adsorbţie dublă (specifică, datorită antigenului fosfatidic, şi nespecifică, datorită kaolinului, care posedă o mare capacitate adsorbantă), serul a fost adsorbit atît cu kaolin sensibilizat cu antigen cît şi cu kaolin nesensibilizat. Rezultatele obţinute au fost calculate sub formă de coeficienţi de corecţie pentru serul neadsorbit (C_{SN}) şi pentru serul adsorbit cu kaolin sensibilizat (C_{KF}).

În felul acesta, calcularea diferenţei dintre C_{SN} şi C_{KF} permite aprecierea coeficientului de adsorbţie specifică. Aşa cum se vede în tabela nr. 4, în cazul tratării serului cu antigen fosfatidic acest coeficient are valori pozitive, care pot fi luate în consideraţie numai în cazul fracţiunii α_2-globulinice. Valorile pozitive în cazul α_1 şi γ-globulinelor sînt foarte reduse.

Cu alte cuvinte, adsorbţia serului numai cu antigen fosfatidic realizează, concomitent cu o scădere a titrului anticorpilor antifosfatidici, o scădere apreciabilă numai a fracţiunii α_2-globulinice.

DISCUŢII ŞI CONCLUZII

Cercetarea concomitentă a titrului anticorpilor antifosfatid şi a concentraţiei fracţiunilor globulinice din serurile a 131 de bolnavi cu tuberculoză a arătat existenţa unui paralelism între aceste două elemente în sensul unei concentraţii crescute a fracţiunii α_2-globulinice în serurile cu titru antifosfatidic ridicat. Dacă se ţine seama de gradul de activitate al procesului tuberculos, apreciat prin testul de kaolinoaglutinare, se constată că între bolnavii evolutivi şi cei stabilizaţi există o diferenţă statistic semnificativă în ce priveşte concentraţia α_2-globulinelor serice.

Aceste date sugerează ipoteza că anticorpii antituberculofosfatid ar fi localizaţi în fracţiunea serică α_2-globulinică, creşterea titrului acestor anticorpi fiind însoţită de o mărire concomitentă a concentraţiei α_2-globulinelor.

În studiul nostru s-a încercat verificarea acestei ipoteze prin utilizarea adsorbţiei cu antigen a serului imun. Rezultatele au arătat că, atunci cînd adsorbţia se face cu antigen micobacterian complex (corpi bacilari delipidaţi incomplet), în serurile provenite de la bolnavii de tuberculoză se obţine o reducere a titrului aglutinant, concomitent cu o scădere a concentraţiei fracţiunilor globulinice α_2 şi γ. Aceeaşi adsorbţie, practicată cu seruri kaolinoaglutinante pozitive provenite de la bolnavi cu afecţiuni netuberculoase, nu duce la reducerea titrului kaolinoaglutinant, iar concentraţia fracţiunilor serice prezintă o uşoară scădere globală, neinteresînd o anumită fracţiune globulinică.

Dacă adsorbţia serurilor de la bolnavii cu tuberculoză se efectuează cu ajutorul tuberculofosfatidului singur, se obţine, paralel cu scăderea titrului antifosfatidic, o reducere care interesează numai fracţiunea α_2-globulinică.

Aceste rezultate constituie argumente în favoarea ipotezei menţionate mai sus, indicînd că :

1. Anticorpii determinați de antigenul bacilar complex (proteine, acizi nucleici, fosfolipide etc.) sînt globuline care migrează în particular cu fracțiunile serice α_2 și γ, de unde pot fi îndepărtate prin adsorbție cu corpi bacilari parțial delipidați.

2. Anticorpii determinați de antigenele tuberculofosfatidice sînt globuline care migrează împreună cu fracțiunea α_2-globulinică, de unde pot fi eliminați prin adsorbție cu fosfatid bacilar.

3. Anticorpii antituberculofosfatid sînt induși specific de către fosfatidul bacilar, care îi poate fixa și elimina din ser. Anticorpii antifosfatid determinați de fosfatidele eliberate în cursul unor procese netuberculoase (cancer pulmonar [8], boli cu autoanticorpi (9) etc.) nu pot fi eliminați prin adsorbția serului cu fosfatidul bacilar.

4. Deosebirea de comportare dintre anticorpii antituberculofosfatidici, pe de o parte, și cei antifosfatidici nespecifici, pe de altă parte, poate permite diferențierea între tuberculoza evolutivă și alte afecțiuni cu procese distructive importante (neoplasme, ciroză etc.). Din punct de vedere practic, diferențierea se poate face prin adsorbția serului cu corpi bacilari parțial delipidați și titrarea anticorpilor antituberculofosfatid înainte și după adsorbție.

Prin punerea în evidență a unei corelații între valorile titrului anticorpilor antituberculofosfatid și concentrația α_2-globulinelor serice, precum și prin datele furnizate de adsorbția serurilor imune cu antigene micobacteriene, se aduce o confirmare elocventă ipotezei că sediul anticorpilor specifici kaolinoaglutinanți îl constituie fracțiunea serică α_2-globulinică.

Institutul clinic de ftiziologie
București, Șos. Viilor nr. 90

Prezentată la redacție la 8 februarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Takahashi Y., Onodera T., Yamamoto K. I., *The behaviour of three different kinds of antibodies in tuberculosis: antiprotein, antipolysaccharide and antiphosphatide*, J. exp. Med., **114**, 555 (1961).
2. Takahashi Y., *Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatide and its clinical evaluation as a diagnostic test for tuberculosis*, Amer. Rev. Resp. Dis., **85**, 708 (1962).
3. Bovornkitti S., *Serum protein changes in tuberculosis in humans (with particular reference to alpha-2 globulin)*, Amer. Rev. Resp. Dis., **85**, 58 (1962).
4. Allerhand J., Zitrin Ch., *Detection of antibodies in the alpha-2 and gamma globulin fractions of human tuberculous sera*, J. Immunol., **89**, 252 (1962).
5. Georgescu P., Păunescu Eug., *Valoarea electroforezei pe hîrtie ca metodă de investigație în tuberculoza pulmonară*, Probleme de tuberculoză, **2**, 219 (1961).
6. Algeorge G., Păunescu Eug., Stoian M., *Cercetări asupra seroreacției de kaolinoaglutinare cu antigen fosfatidic pentru aprecierea evolutivității leziunilor tuberculoase*, Microbiol., Epidemiol., Parazitol., **11**, *4*, 321 (1964).
7. Algeorge G., Păunescu Eug., Stoian M., *Studiul seroreacției de kaolinoaglutinare cu antigen fosfatidic în tuberculoza experimentală și umană*, Probleme de tuberculoză, **5**, 61 (1964).
8. Cabanne F., Dusserre P., Michiels R., *Phospholipides et stromaréaction cancéreuse à cellules épithélioïdes*, Ann. Anat. Pathol., **8**, 245 (1963).
9. Seeber C., *Der Phosphatid-Kaolin-Agglutinationstest*, Mtschr. Tbk. Bekämpf., **6**, 232 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 163–176 (1965)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENȚEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

Nota I. STUDIUL COMPARATIV AL CONȚINUTULUI ÎN VITAMINĂ C LA CEREALE DE TOAMNĂ, ÎN TIMPUL IERNII

I. BRAD

577.16 : 633.1

Rezumat. — În lucrare sînt prezentate rezultatele comparative obținute la determinarea vitaminei C la cereale de toamnă, la specii, soiuri și organe diferite și plante crescute pe teren îngrășat sau neîngrășat. Se ajunge la concluzia că acumularea vitaminei C este un proces favorabil rezistenței la ger, deoarece, în general, vitamina C se găsește în cantitate mai mare în organele plantelor mai rezistente, datorită caracteristicilor de specie, soi sau nutriției minerale. Nu se constată însă o concordanță deplină între rezistență și conținutul de vitamină C. Dat fiind că în frunză, organ mai puțin rezistent la ger, se găsește o cantitate mult mai mare de vitamină C decît în nodul de înfrățire și deoarece conținutul de vitamină C în frunză este mai mare, iar în nodul de înfrățire este mai mic în anii mai puțin friguroși și mai ploioși, se impun cele mai mari rezerve în considerarea conținutului de vitamină C ca indice categoric de triere a plantelor după rezistența la ger. Pentru aprecierea rezistenței la ger, este necesară luarea în considerație și a creșterilor și scăderilor suferite de conținutul în vitamină C în funcție de temperatură. Îngrășămintele fosfatice și potasice favorizează acumularea vitaminei C în timpul iernii, iar azotatul de amoniu defavorizează această acumulare. Interpretarea conținutului de vitamină C trebuie făcută ținîndu-se seama și de alte rezultate referitoare la activitatea unor enzime sau la conținutul unor substraturi.

Cercetările referitoare la procesele biochimice ce se desfășoară în plante în timpul iernii au căutat să stabilească dacă există o corelație între valorile unor indici biochimici și rezistența la ger. Aceasta s-a făcut atît în scopul găsirii unor indici de triere a plantelor, îndeosebi a cerealelor, după rezistență, cît și în scopul lămuririi proceselor legate de biochimia supraviețuirii plantelor. În ultimă analiză, s-a urmărit găsirea unor procedee de dirijare a metabolismului plantelor pentru mărirea rezistenței lor.

În cazul particular al cerealelor de toamnă, găsirea acestor procedee este deosebit de importantă, deoarece unele soiuri au o producție

mai mare, dar o rezistență slabă, fapt care aduce prejudicii producției acestor cereale.

În legătură cu acest subiect, literatura conține un număr relativ mic de lucrări. În materialul bibliografic am enumerat lucrări în legătură cu conținutul de vitamină C și influența temperaturilor scăzute asupra plantelor, publicate atît înainte de începerea cercetărilor prezentate în această lucrare cît și ulterior.

În legătură cu conținutul de vitamină C, Lvov și Altuhova [1] indică o corelație strînsă între rezistența la ger și conținutul în vitamină C din frunza de grîu. Zemlianuhin [2], [3] consideră că ar exista o corelație între temperatură, acumularea și distribuția acidului ascorbic și caracteristicile morfologice și fiziologice la diferite plante. Kușnirenko [4], [5] cercetînd particularitățile fiziologice ale porumbului și tomatelor călite la frig prin temperaturi alternative, arată că frunzele și fructele provenite de la plante călite au mai multă vitamină C. Ovcearov [11] constată creșterea conținutului de vitamină C la plante o dată cu scăderea temperaturii. Saakian [6] arată că la vița de vie se constată un conținut mai mare de vitamină C în frunzele soiurilor mai rezistente. Okunțov și Aksenova [7] cercetează influența călirii asupra conținutului de acid ascorbic la grîul de toamnă și constată o creștere a conținutului de vitamină C, scăderea conținutului de acid dehidroascorbic, precum și creșterea sumei celor două substanțe în frunză. Mininberg [10] constată un conținut mai mare de vitamină C în frunze în timpul verii la plantele îngrășate cu NPK și microelemente și care în timpul iernii s-au dovedit a avea un conținut mai mare de zaharuri și au fost mai rezistente. Poluşciuk [8] analizează variația conținutului de vitamină C în scoarța de nuc și constată creșterea conținutului o dată cu scăderea temperaturii din timpul iernii. Andrews [9] constată o corelație între conținutul de vitamină C, concentrația sucului celular și rezistența la frig a grîului de toamnă în timpul iernii. Cîteva concluzii enunțate în comunicarea de față în legătură cu conținutul de vitamină C și rezistența la ger au fost prezentate și în lucrarea lui Brad, Laszlo, Valuță și Sotiriu [13].

Referitor la influența nutriției minerale asupra rezistenței la ger, numeroase indicații din literatură arată că fosforul și potasiul favorizează rezistența la ger, în timp ce azotul micșorează această rezistență, mai ales atunci cînd este dat în cantități mari [19—21].

Observațiile fenologice și numărarea plantelor pierite din cauza gerului executate de noi, și care vor fi publicate într-o lucrare ulterioară[1], au dus la rezultate asemănătoare, care arată că nutriția minerală cu cantități mari de azot influențează negativ rezistența plantelor în timpul iernii. În literatură nu am găsit indicații referitoare la influența nutriției minerale asupra conținutului în vitamină C la cereale de toamnă.

Rezultatele prezentate fac parte dintr-un ansamblu de cercetări executate între anii 1958 și 1962, S-au studiat comparativ secara, grîul și orzul cultivate pe teren neîngrășat, orzul neîngrășat sau îngrășat dife-

[1] *Studiu comparativ al conținutului în azot total și aminoacizi liberi la cerealele de toamnă în timpul iernii* (în curs de redactare).

renţiat cu superfosfat, sare potasică şi azotat de amoniu (1958—1961), precum şi un număr de 36 de soiuri de grîu (1961—1962). Analizele au fost executate separat pe frunze şi pe nodul de înfrăţire cu hipocotil. S-au analizat simultan conţinutul în vitamină C, conţinutul în substanţe reducătoare directe şi reducătoare totale, conţinutul în proteină brută şi aminoacizi, conţinutul în cenuşă, fosfor şi potasiu, aciditatea totală titrabilă, activitatea catalazei şi peroxidazei, substanţa uscată, capacitatea de reţinere a apei şi altele.

Prin analiza simultană în decursul mai multor ani a unui număr mai mare de indici biochimici şi fiziologici care pot fi corelaţi metabolic, prin compararea rezultatelor constatate la plante făcînd parte din specii şi soiuri diferite, prin compararea rezultatelor constatate la plante crescute în condiţii de nutriţie minerală diferenţiată şi prin compararea rezultatelor constatate la organe diferite ale acestor plante care se caracterizează prin rezistenţă diferită şi prin răspuns diferit la variaţiile de temperatură, s-a urmărit : să se găsească indici siguri de triere a plantelor după rezistenţă, să se acumuleze o sumă de date care să contribuie la stabilirea bazelor biochimice ale procesului de supravieţuire a plantelor, să se contribuie la depistarea în mare a punctelor, a secvenţelor din metabolism unde este necesar să se intervină şi a sensului în care trebuie să se desfăşoare unele procese, pentru ca metabolismul plantei să favorizeze rezistenţa la ger.

În rîndurile care urmează sînt prezentate rezultatele obţinute la determinarea vitaminei C.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru efectuarea studiului comparativ între specii au fost alese secara din soiul Petkus— foarte rezistentă la ger — grîul din soiul A-15—cu rezistenţă medie la ger — şi orzul din soiul Cenad 396 (C-396) — mai puţin rezistent la ger.

Pentru efectuarea studiului comparativ al conţinutului de vitamină C în funcţie de nutriţia minerală, cu efect pozitiv şi negativ asupra rezistenţei la ger, s-a lucrat cu orzul C-396. Au fost concepute 6 variante : $N_0P_0K_0$, $N_1P_1K_1$, $N_3P_1K_1$, $N_1P_3K_1$, $N_1P_1K_3$, $N_3P_3K_3$. În oricare variantă N_1 = 30 kg/ha N, P_1 = 30 kg/ha P_2O_5 şi K_1 = 30 kg/h K_2O. S-a întrebuinţat azotat de amoniu, superfosfat şi sare potasică (KCl), produse tehnice granulate.

Îngrăşămintele au fost administrate înainte de însămînţare, sub cultivator, pentru a realiza o concentraţie mai mare pe adîncime mică.

Pentru executarea studiului comparativ între soiurile de grîu au fost alese 36 de soiuri cu rezistenţă variabilă, între care : Minhardy şi Lutescens 1060/10, soiuri foarte rezistente, şi Étoile de Choisy şi San Pastore, soiuri foarte puţin rezistente.

Pentru executarea studiului comparativ între organe cu rezistenţă diferită s-au făcut determinări separat pe frunze şi pe nodul de înfrăţire cu hipocotil la toate variantele de mai sus.

Toate experienţele au fost executate pe sol brun-roşcat de pădure, în terenul experimental al Institutului de cercetări pentru cereale şi plante tehnice. Însămînţările cu secară, grîu şi orz, în teren neîngrăşat sau îngrăşat, au fost montate în 5 repetiţii a cîte 20 m^2 fiecare parcelă. Experienţele cu soiuri de grîu au fost executate în trei repetiţii a cîte 4,5 m^2 fiecare. Pentru toate experienţele s-au însămînţat cîte 450 de boabe germinabile /m^2.

Recoltarea s-a făcut ţinîndu-se seama cît mai mult posibil de variaţiile de temperatură, prezentate în graficele anexate.

De la fiecare repetiţie au fost recoltate 30—50 de plante. După recoltare, plantele au fost triate, eliminîndu-se cele cîteva exemplare foarte puternic crescute sau foarte mici. Plantele au fost spălate repede cu apă rece şi au fost zvîntate forţat cu hîrtie de filtru. A fost apoi separată frunza de nodul cu hipocotil şi de rădăcini. Asupra rădăcinilor nu au fost executate determinări. Frunza şi nodul cu hipocotil au fost mărunţite rapid. După omogenizarea probelor, o parte din material a fost pus la uscat în etuvă, pentru analizele care nu necesitau material verde proaspăt. Vitamina C a fost determinată din materialul verde proaspăt, prelucrat în modul expus mai înainte, prin cîntărirea a 2,5-5 g de probă verde, care a fost mojarată cu acid oxalic 2% şi adusă la 50—100 ml cu acid oxalic 1%. După agitare şi lăsare la depunere timp de 15 minute, s-a dozat vitamina C după metoda iodometrică (14—17) cu soluţie apoasă n/300 de I_2 în IK, în prezenţă de amidon. Această metodă nu a fost folosită la dozarea vitaminei C din soiurile de grîu. În acest caz, vitamina C a fost dozată atît în frunze cît şi în nodul cu hipocotil după metoda Tilmans cu 2,6-diclorfenolindofenol [14—16].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza rezultatelor prezentate în tabelele nr. 1, 2 şi 3 duce la constatarea că frunzele au un conţinut mai mare de vitamină C decît nodul de înfrăţire la oricare dintre variantele analizate, fără nici o excepţie şi indiferent de metoda de dozare utilizată. Se observă din raportul între conţinutul de vitamină C din frunze şi conţinutul de vitamină C din nod, că în frunze se poate găsi de 1,5—6 ori mai multă vitamină C decît în nod. Dar nodul de înfrăţire este mult mai rezistent la ger decît frunza, fapt care pune sub semnul întrebării existenţa unei corelaţii depline între rezistenţa la ger şi conţinutul de vitamină C, din moment ce un organ mult mai rezistent conţine o cantitate mult mai mică de vitamină C.

Dacă se analizează tabelul 1, care conţine rezultatele comparative între secară, grîu şi orz, se constată un conţinut mai mic de vitamină C la orz decît la celelalte cereale în orice moment al perioadei de iarnă, inclusiv luna martie. Secara, mai rezistentă decît grîul, nu are întotdeauna un conţinut mai mare de vitamină C, nici în nod, nici în frunză. Totuşi, la 23 I şi 20 II 1959, la 29 I şi 12 II 1960 şi la 26 I şi 9 II 1961, date care corespund perioadelor cu scăderi puternice de temperatură, conţinutul de vitamină C la nodul de secară este cel puţin egal sau mai mare decît conţinutul de vitamină C la nodul de grîu. În frunze, la cele mai multe determinări conţinutul de vitamină C la grîu este mai mare decît la secară.

Analizînd tabelele şi ţinînd seama de variaţiile de temperatură (fig. 1—3), se constată că deşi conţinutul de vitamină C este mai mare la frunze decît la nod, la frunze conţinutul scade paralel cu înaintarea în iarnă, cu scăderea temperaturii medii şi cu durata temperaturii scăzute. În nodul cu hipocotil, dimpotrivă, scăderea temperaturii provoacă creşterea conţinutului de vitamină C, fenomen mai evident în anul 1958—1959. În ceilalţi ani, care au fost mai puţin friguroşi şi cu precipitaţii mai bogate, acest fenomen este mai puţin clar, diferenţele în funcţie de temperatură

fiind mai mici. Merită să fie reținut faptul că în anii 1959—1961, conținutul mediu de vitamină C din frunze a fost mai mare decît în 1958—1959 la toate plantele. În nodul de înfrățire cu hipocotil, conținutul de vitamină C are media cea mai mică în 1960—1961, anul cu cele mai multe precipitații și cele mai puține perioade cu temperaturi sub 0°C. Acest fapt scoate în evidență variația antiparalelă a conținutului de vitamină C din frunze față de nodul de înfrățire. Conținutul de vitamină C crește în nodul de înfrățire cu hipocotil, organ mai rezistent decît frunza o dată cu scăderea temperaturii, deși conținutul este mai mic. Aceasta scoate în evidență o caracteristică extrem de importantă, care poate fi folosită ca indice de triere. Micșorarea puternică a conținutului de vitamină C o dată cu scăderea temperaturii, indiferent de valoarea absolută, poate fi considerată ca indice de nerezistență la ger. Intensitatea creșterilor și

Tabela nr. 1

Variația conținutului de vitamină C (în mg/100 g substanță verde) în nodul cu hipocotil *(n)* și frunză *(f)* de secară, grîu și orz 1958–1961

Data / Varianta	12.XII. 1958	23.XII. 1958	23.I. 1959	20.II. 1959	7.II. 1959	19.III. 1959	8.IV. 1959	24.IV. 1959	26.V. 1959	9.VI. 1959
Secară *n*	62,41	51,92	68,46	76,60	52,40	31,88	51,64	Faza de		
Grîu *n*	59,29	57,06	59,77	68,62	54,50	41,90	58,89			
Orz *n*	54,09	42,15	47,81	65,50	45,06	35,52	58,69			
Secară *f*	187,75	175,82	190,19	120,25	233,70	174,91	155,37	187,45	195,93	181,99
Grîu *f*	252,24	197,41	194,35	106,40	248,38	196,77	196,14	210,10	171,25	125,44
Orz *f*	138,86	132,12	135,85	115,44	102,18	99,30	194,79	183,12	158,16	45,75

Data / Varianta	14.XII. 1959	29. I. 1960	12.II. 1960	15.III. 1960	30.IV. 1960	17.V. 1960
Secară *n*	52,81	71,79	81,53	26,80	Faza de	
Grîu *n*	46,21	62,56	72,30	47,41		
Orz *n*	34,89	51,28	53,84	35,04		
Secară *f*	291,90	244,00	221,50	137,00	170,30	200,70
Grîu *f*	264,50	304,60	249,20	131,70	191,50	167,60
Orz *f*	159,40	210,20	143,00	122,60	176,00	177,50

Data / Varianta	20.XII. 1960	11.I. 1961	26.I. 1961	9.II. 1961	22.II. 1961	15.III. 1961	8.IV. 1961	9.V. 1961	30.V. 1961
Secară *n*	33,78	36,29	40,62	52,86	73,00	56,68	59,99	Fază de	
Grîu *n*	42,50	45,64	35,35	52,32	77,11	52,49	27,37		
Orz *n*	25,06	32,60	28,12	38,68	52,43	51,44	27,37		
Secară *f*	156,00	258,90	185,40	240,40	300,20	225,70	175,10	222,70	205,50
Grîu *f*	213,60	256,40	210,40	324,00	318,70	228 80	144,20	189,50	149,90
Orz *f*	168,90	198,81	146,60	231,00	241,60	183,60	197,40	147,70	133,80

Tabela nr. 2

Variaţia conţinutului de vitamină C (în mg/100 g substanţă verde) în nodul cu hipocotil (*n*) şi frunze (*f*) de orz însămînţat pe teren neîngrăşat sau îngrăşat cu NPK în diferite proporţii 1958—1961

Varianta \ Data	12.XII. 1958	23.XII. 1958	12.I. 1959	20.II. 1959	7.III. 1959	19.III. 1959	8.IV. 1959	24.IV. 1959	26.V. 1959	9.VI. 1959
Orz $N_0P_0K_0$ *n*	54,09	42,15	40,10	65,50	45,66	35,52	58,69			
" $N_3P_1K_1$ *n*	35,36	34,95	45,81	62,20	44,37	31,42	55,71	Faza de		
" $N_1P_3K_1$ *n*	58,48	43,18	46,26	67,30	37,20	30,51	52,09	împăiere		
" $N_1P_1K_3$ *n*	56,69	39,57	45,15	86,25	31,44	31,88	45,30			
" $N_0P_0K_0$ *f*	138,86	132,12	103,12	115,44	102,18	99,30	194,79	183,12	158,16	45,75
" $N_3P_1K_1$ *f*	127,74	128,06	104,36	102,90	94,32	93,85	167,71	169,62	171,25	56,01
" $N_1P_3K_1$ *f*	164,35	134,41	107,96	109,45	110,04	90,18	159,90	130.11	158,16	38,86
" $N_1P_1K_3$ *f*	158,10	143,96	112,06	113,62	96,42	122,07	135,90	146,01	167,73	34,44

Varianta \ Data	14.XII. 1959	29.I. 1960	12.II. 1960	15.III. 1960	30.IV. 1960	17.V. 1960
Orz $N_0P_0K_0$ *n*	34,89	51,28	53,84	35,04		
" $N_1P_1K_1$ *n*	47,16	46,15	61,02	41,23	Faza de	
" $N_3P_1K_1$ *n*	43,38	51,28	55,38	44,32	împăiere	
" $N_1P_3K_1$ *n*	46,91	60,51	64,10	53,60		
" $N_1P_1K_3$ *n*	42,44	55,38	55,89	43,29		
" $N_3P_3K_3$ *n*	55,64	57,43	49,22	38,13		
" $N_0P_0K_0$ *f*	159,40	210,20	143,00	122,60	176,00	177,60
" $N_1P_1K_1$ *f*	210,30	157,90	128,20	132,90	157,50	150,50
" $N_3P_1K_1$ *f*	199,00	215,20	126,10	138,50	179,10	169,60
" $N_1P_3K_1$ *f*	202,70	225,60	123,00	173,10	150,30	133,40
" $N_1P_1K_3$ *f*	187,60	217,40	130,70	140,10	163,80	130,40
" $N_3P_3K_3$ *f*	204,60	234,80	116,90	138,10	159,50	144,50

Varianta \ Data	20.XII. 1960	11.I. 1961	26.I. 1961	9.II. 1961	22.II. 1961	15.III. 1961	8.IV. 1961	9.V. 1961	30.V. 1961
Orz $N_0P_0K_0$ *n*	25,06	32,60	39,66	38,49	52,40	51,94			
" $N_1P_1K_1$ *n*	22,88	31,51	29,06	43,17	70,93	42,50			
" $N_3P_1K_1$ *n*	17,43	34,77	26,71	42,65	61,68	41,34	Faza de		
" $N_1P_3K_1$ *n*	29,61	31,51	50,47	47,45	53,45	50,88	împăiere		
" $N_1P_1K_3$ *n*	18,52	28,25	40,16	43,69	64,76	48,76			
" $N_3P_3K_3$ *n*	29,32	30,43	41,52	34,33	56,56	44,52			
" $N_0P_0K_0$ *f*	168,88	198,88	146,60	231,00	241,58	183,60	197,40	147,72	133,80
" $N_1P_1K_1$ *f*	190,68	185,84	198,83	184,15	259,05	193,95	189,82	124,23	148,80
" $N_3P_1K_1$ *f*	171,06	172,80	177,18	185,19	189,52	202,96	183,75	170,28	125,15
" $N_1P_3K_1$ *f*	164,52	180,40	217,18	217,44	210,74	277,02	161,98	176,65	155,22
" $N_1P_1K_3$ *f*	151,45	211,90	208,26	191,43	230,27	182,32	193,36	147,70	129,56
" $N_3P_3K_3$ *f*	177,60	178,33	200,93	176,86	197,37	160,08	194,38	137,06	129,56

Tabela nr. 3

Ordonarea unor soiuri de grîu după conținutul de vitamină C din frunze și din nodurile de înfrățire cu hipocotil (mg/100 g substanță verde) februarie 1962

Ordonarea după conținutul din frunze		Ordonarea după conținutul din nod	
1 Miciurinka	176,6	1 405 B	34,6
2 Lutescens 1060/10	153,6	2 Miciurinka	30,7
3 Harrach	152,8	3 Odessa 3	30,7
4 Hostianum 237	145,9	4 Minhardy	30,7
5 Bezostaia 4	145,9	5 131 C	30,7
6 Odessa 3	142,1	6 804 B	30,7
7 Minhardy 1	138,2	7 Studina 159	30,7
8 Kooperatorka	138,2	8 Mironovskaia 264	30,7
9 A 15	136,4	9 Skorospelka 3	30,5
10 457 B	136,2	10 Bezostaia 4	26,8
11 Ponca	135,2	11 440 C	26,8
12 Wichita	134,5	12 Beloțerkovskaia 198	26,8
13 440 C	134,4	13 578 BB	26,8
14 Lutescens 329	134,5	14 530 B	26,8
15 Concho	132,5	15 Bezostaia 1	23,1
16 Beloțerkovskaia 198	123,8	16 415 C	23,1
17 405 B	122,8	17 Harrach	19,9
18 578 BB	122,8	18 Lutescens 1060/10	19,2
19 Bkankut 1201	128,8	19 Hostianum 237	19,2
20 131 C	120,8	20 A15	19,2
21 San Pastore	120,8	21 457 B	19,2
22 804 B	115,2	22 Lutescens 329	19,2
23 Studina 159	115,2	23 San Pastore	19,2
24 Bezostaia 1	115,2	24 Étoile de Choisy	19,2
25 Étoile de Choisy	115,2	25 Iași 645	19,2
26 Triumph	115,2	26 301	19,2
27 495 C	109,5	27 Osetinskaia	19,2
28 Mironovskaia 264	108,5	28 Cenad 107	19,2
29 Iași 645	107,5	29 Odvos 241	19,2
30 301	103,8	30 Motinave	19,2
31 Osetinskaia 3	103,5	31 Wichita	17,6
32 Cenad 117	99,8	32 Concho	15,3
33 Skorospelka 3	99,8	33 Bankut	15,3
34 520 B	99,8	34 Ponca	12,5
35 Motinave	96,2	35 Kooperatorka	11,5
36 Odvos 241	92,2	36 Triumph	11,5

scăderilor conținutului de vitamină C întregește acest indice de triere. Concluzia este întărită și de constatarea că în nodul de înfrățire conținutul de vitamină C este mai mic în anii ploioși și cu temperaturi medii mai mici dar este mai mare în frunze în aceiași ani. Aceste condiții climatice favorizează mult creșterea plantelor, proces cunoscut ca defavorizînd rezistența la ger.

Analiza rezultatelor din tabela nr. 2, care conține cifrele comparative ale variantelor agrotehnice cu nutriție diferențiată, conduce la aceleași constatări în ceea ce privește variația conținutului de vitamină C în funcție de temperatură și precipitații, în cadrul aceluiași an sau în următorii ani. Se constată clar că în timpul iernii, la varianta $N_3P_1K_1$, în marea

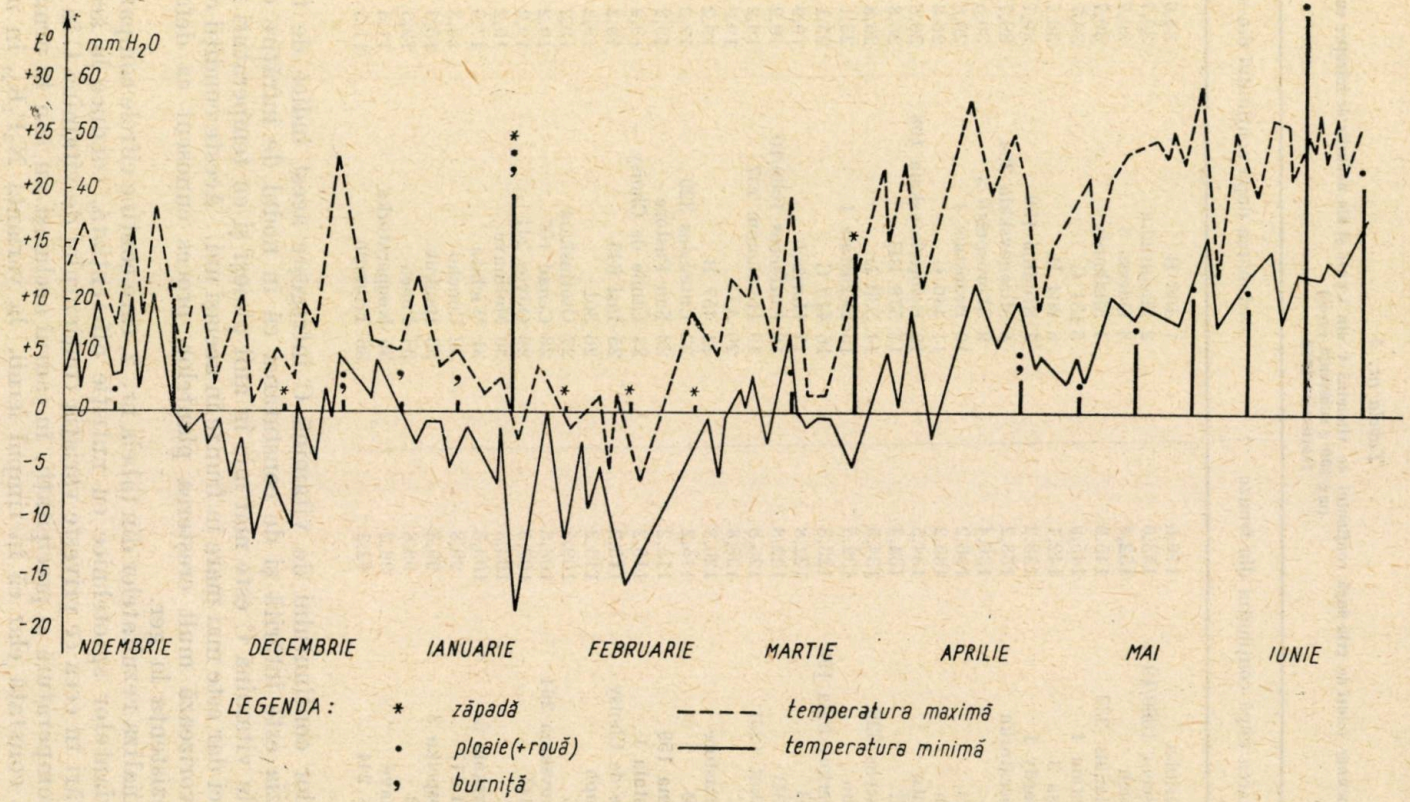


Fig. 1. — Variația temperaturilor maxime și minime, precum și a precipitațiilor în perioada 1.XI.1958—30.VI.1959.

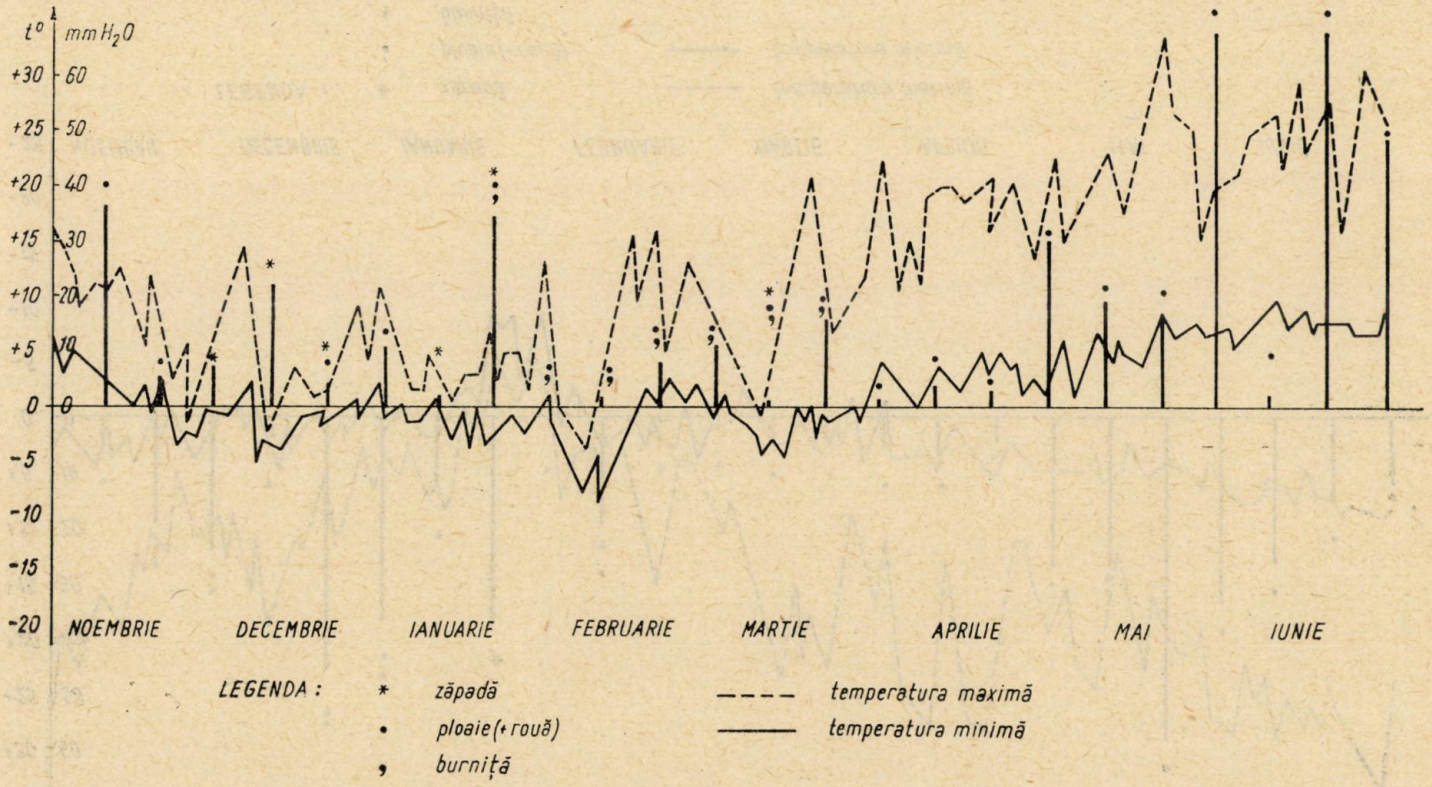


Fig. 2. — Variația temperaturilor maxime și minime, precum și a precipitațiilor în perioada 1.XI.1959—30.VI.1960.

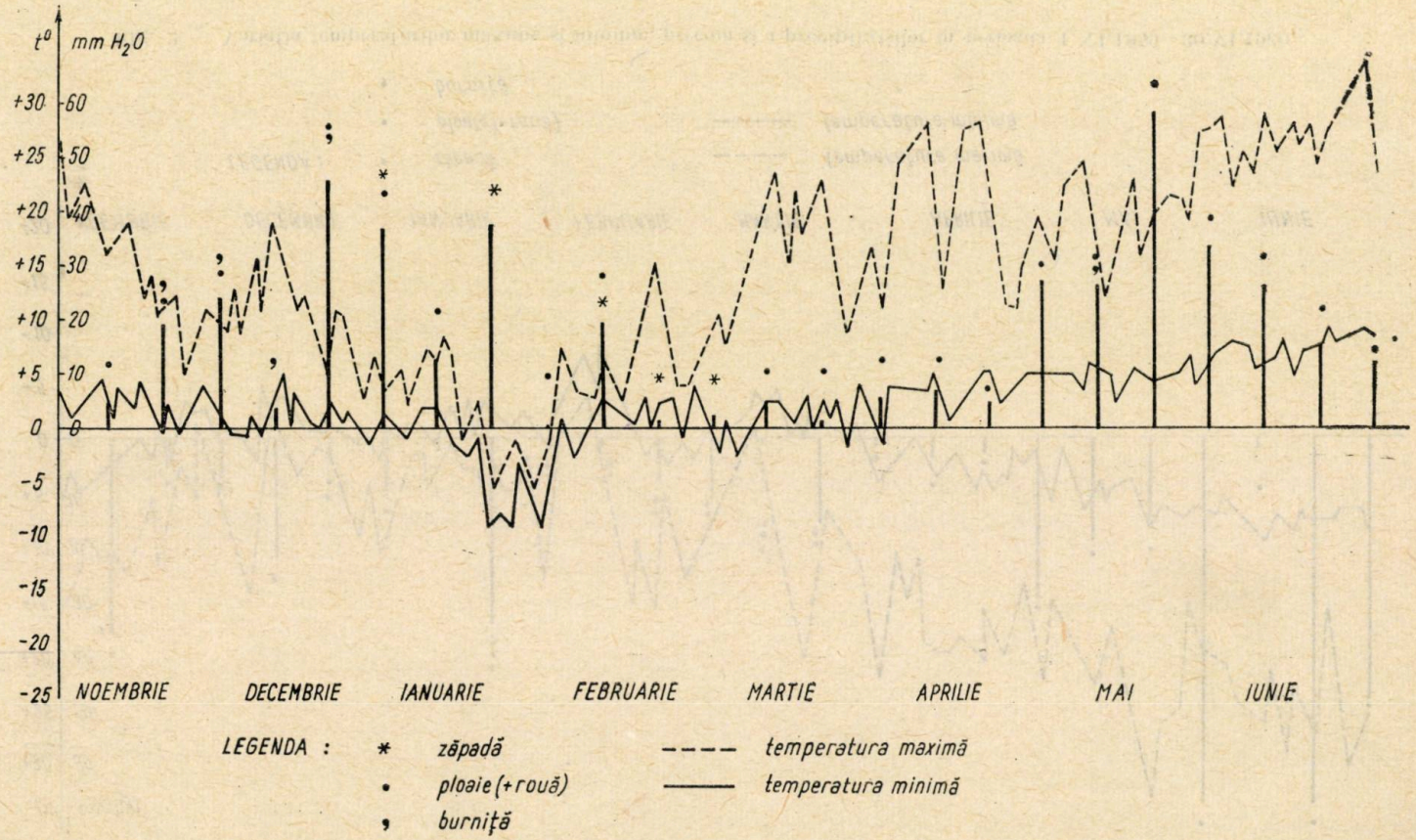


Fig. 3. — Variația temperaturilor maxime și minime, precum și a precipitațiilor în perioada 1.XI.1960—30.VI.1961.

majoritate a cazurilor conținutul de vitamină C este mai mic sau cel mult egal cu conținutul de vitamină C din variantele $N_1P_3K_1$ sau $N_1P_1K_3$. Aceasta se constată atît în frunze cît și în nodul de înfrățire. În timpul verii, conținutul de vitamină C la varianta $N_3P_1K_1$ are tendința să fie mai mare. Este adevărat însă că diferențele constatate între variantele agrotehnice nu sînt atît de mari decît cele constatate între organe și specii. Aceste constatări arată că îngrășămintele fosfatice și potasice, care favorizează rezistența la ger, favorizează și acumularea de vitamină C în plante. Această acumulare este, desigur, favorizată de intensificarea sintezei acizilor uronici și de micșorarea intensității proceselor care duc la transformarea vitaminei C. Îngrășămintele fosfatice și potasice acționează în timpul iernii în acest sens, spre deosebire de îngrășămintele azotate.

Analiza rezultatelor din tabelul nr. 3, obținute prin metoda cu 2,6-diclorfenolindofenol, nu aduce nici o schimbare în ceea ce privește constatarea unei diferențe mari de conținut de vitamină C între frunze și nodul de înfrățire cu hipocotil. Nu se modifică nici concluzia că nu există o concordanță deplină între conținutul de vitamină C și rezistența la ger. Astfel, soiurile Minhardy, Beloțerkovskaia 198, Hostianum 237, Lutescens 1060/10, Odessa 3, Lutescens 329, care sînt foarte rezistente, nu au conținutul cel mai mare de vitamină C, dar se situează totuși printre soiurile cu conținut mare de vitamină C. Soiurile Fortunato, San Pastore, Étoile de Choisy, Bankut 1201, Kooperatorka, Odvos 241, cu rezistență slabă la ger, nu au conținutul cel mai mic de vitamină C. Totuși, ele se plasează printre soiurile cu conținut mic de vitamină C. Se constată de asemenea că ordonarea după conținutul de vitamină C din frunze este diferită de aceea după conținutul de vitamină C din nodul cu hipocotil, fapt care constituie un nou argument care arată inexistența unei corelații perfecte între conținutul de vitamină C și rezistența la ger.

Concluzia ce se poate desprinde din analiza întregului material este că acumularea vitaminei C este un proces favorabil rezistenței la ger. Conținutul mai mare de vitamină C la secară și grîu, specii mai rezistente decît orzul, atît în nodul cu hipocotil cît și în frunză, conținutul mai mare de vitamină C la plantele nutrite cu îngrășăminte fosfatice și potasice, față de plantele nutrite cu îngrășăminte azotate în cantități mai mari, creșterea conținutului de vitamină C în perioada scăderilor de temperatură în nodul cu hipocotil, conținutul de vitamină C mai mare în nodul cu hipocotil în anii cu temperaturi medii mai mici, conținutul de vitamină C în general mare la soiurile de grîu mai rezistente, conținurul de vitamină C în general mic la soiurile de grîu slab rezistente permit formularea concluziei de mai sus.

Conținutul mai mare de vitamină C, în frunze față de nod, organ mai rezistent, conținutul de vitamină C egal sau mai mare la grîu față de secară, conținutul mai mare de vitamină C în frunze în anii cu temperaturi medii mai mici, conținutul de vitamina C egal sau mai mare la unele soiuri de grîu cu rezistență slabă față de unele soiuri cu rezistență medie, conținutul de vitamină C nu întotdeauna cel mai mare la soiurile de grîu cele mai rezistente, duc la concluzia că conținutul de vitamină C nu este

un indice categoric de triere după rezistența la ger. Soiurile rezistente nu beneficiază întotdeauna de un conținut mare de vitamină C. Rezistența mai mare a unor plante este realizată prin alte mecanisme, care compensează cu prisosință un eventual conținut mic de vitamină C.

Se pot trage însă și alte concluzii, dacă se discută conținutul de vitamină C legat de procesele în care aceasta poate să intervină. Vitamina C poate interveni în procesele de regenerare a glutationului [18], este oxidată de sistemul citocromoxidază—citocrom *c*, polifenoloxidază și alte oxidaze [22]. Vitamina C stimulează, transformîndu-se bineînțeles, arginaza, catalaza, esterazele, catepsina, papaina [23], fiind legată și de activitatea amilazei [24]. Dar diferitele procese în care se transformă acidul ascorbic pot să aibă cu totul alte consecințe pentru rezistența la ger. Dacă un conținut mic de vitamină C este legat de tulburări ale proceselor sale de sinteză, de o respirație intensă sau de o proteoliză intensă, aceasta semnifică nerezistență la ger. Dacă un conținut de vitamină C mai mic este legat de o activitate mai mare a amilazei sau a peroxidazei, de un lanț de procese care duc la acumulare de substanțe de protecție sau de economisire de energie, atunci un conținut egal sau mai mic de vitamină C față de o altă plantă nu mai înseamnă nerezistență la ger. Probabil că printre acestea se găsesc cauzele neconcordanțelor între rezistența la ger și conținutul de vitamina C. Este însă de așteptat ca la plantele mai rezistente, care au o stare de latență profundă, transformarea vitaminei C în acid dehidroascorbic să fie mai slabă. De aceea determinarea acidului dehidroascorbic executată de unul dintre autori [7] în perioada de călire se impune pentru aprecierea rezistenței la ger. Calcularea raportului vitamină C/acid dehidroascorbic ar aduce o îmbunătățire a acestei metode pentru trierea soiurilor. Aceeași concluzie s-ar putea formula și pentru precursorii vitaminei C sau cel puțin pentru proximul precursor, acidul 3-cetogulonic. De transformarea acestuia depinde conținutul de vitamina C și, bineînțeles, și de activitatea enzimelor legate de lanțul de transformări 3-cetogulonat — ascorbat — dehidroascorbat. Acceptîndu-se însă posibilitatea ca să existe un conținut egal al celor trei substanțe la soiuri diferite ca rezistență, este necesară luarea în considerație și a celorlalți indici. Dacă unui conținut oarecare de vitamină C, îi corespunde un conținut mic de zaharuri, un conținut mare de aminoacizi liberi și proteine totale și o activitate peroxidazică mică, această situație are cu totul altă semnificație decît dacă același conținut de vitamină C sau unul mai mic este asociat cu un conținut mare de zaharuri, un conținut mic de proteine totale și aminoacizi liberi și o activitate peroxidazică mare. Această inversare, dată ca exemplu, se observă între frunza slab rezistentă și nodul cu hipocotil mai rezistent la oricare plantă [2].

În altă ordine de idei, determinarea ascorbatoxidazei sugerează ideea utilizării acestei enzime pentru dozarea vitaminei C. Dacă s-ar doza

[2] Brad I., *Studiu comparativ al conținutului de zahăr direct reducător și total la cereale de toamnă în timpul iernii*, lucrare în curs de redactare.

Brad I., *Studiu comparativ al activității peroxidazei la cereale de toamnă în timpul iernii*, lucrare în curs de redactare.

două probe paralele, una ca atare, iar alta după oxidarea acidului ascorbic prin adăugarea de ascorbatoxidază, atunci cred că s-ar obține rezultatul cel mai apropiat de realitate în ceea ce privește conținutul de vitamină C. Dozarea după un asemenea procedeu ar aduce unele mici modificări ale ordonării după conținutul de vitamină C. Concluziile consider însă că nu s-ar schimba, deoarece nu există argumente care să poată să susțină obligativitatea existenței unei concordanțe depline între rezistența la ger și conținutul de vitamină C. Cu cît complexitatea cercetărilor și numărul determinărilor este mai mare, cu atît rezultă mai clar inexistența unei corelații depline între rezistența la ger și conținutul de vitamină C. Nu susținem prin aceasta că se micșorează valoarea acestui indice pentru interpretarea fenomenelor de rezistență sau pentru trierea soiurilor. Atragem numai atenția asupra necesității interpretării complexe a datelor și a determinărilor într-un ansamblu explicit.

CONCLUZII

1. Acumularea vitaminei C este un fenomen favorabil rezistenței la ger, indicînd desfășurarea unor procese metabolice astfel încît favorizează rezistența.

2. Nu există o concordanță deplină între conținutul de vitamină C și rezistența la ger, dar există tendința acumulării unei cantități mai mari de vitamină C la plantele mai rezistente. Datorită acestui fapt, conținutul de vitamină C nu poate constitui singur un indice sever de triere.

3. Pentru îmbunătățirea ca indice de triere a dozării vitaminei C, este indicată luarea în considerație a variației conținutului de vitamină C în funcție de temperatură. Scăderea puternică a conținutului de vitamină C o dată cu scăderea temperaturii indică o mai slabă rezistență față de cazul în care se constată creșterea conținutului de vitamină C în aceleași condiții.

4. Asocierea determinării conținutului de vitamină C cu determinarea proximului succesor și a proximului precursor, respectiv a acidului dehidroascorbic și 3-cetogulonic, și a enzimelor legate de acest lanț apare ca o condiție de perspectivă. Raporturile dintre conținutul acestor substanțe ar permite o mai bună triere a plantelor.

5. Pentru trierea corectă a soiurilor este necesară de asemenea asocierea determinării conținutului de vitamină C cu rezultatele obținute pentru alți indici. Aceasta ar aduce după sine și înțelegerea mai bună a mecanismului biochimic al rezistenței.

6. Superfosfatul și sarea potasică favorizează acumularea vitaminei C față de azotatul de amoniu, care nu favorizează acumularea acesteia în timpul iernii.

Secția de fiziologie și biochimie vegetală.
I.C.C.P.T., Fundulea-București

Prezentată la redacție la 25 iunie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Lvov S. D., Altuhova L. A., *Vitamin C i ego sveazi s morozoustoicivosti ozimih sortov pșeniți*, Dokladî Akad. Nauk SSSR, 1951, **80**, 113.
2. Zemlianuhin A. A., *Sezonnie izmeneniia soderjaniia vitamina C v nekotorîh rasteniiah*, Agrobiologhiia, 1955, **2**, 136.
3. Zemlianuhin A. A., *Fiziolothough iceskaia izmeneniia v rastenii, vzivaemie deistviem askorbinovoi kisloti*, Fiziologhiia rastenii, 1956, **3**, 313.
4. Kușnirenko S. V., *Particularitățile fiziologice ale roșiilor și porumbului călite la frig prin temperaturi alternative*, Bul. de informare științifică, Academia R.P.R., I.S.R.S., 1958, **VII**, 12.
5. Kușnirenko S. V., *Fiziologhiceskie osobennosti tomatov i kukuruzi, zakalennih k holodu peremennimi temperaturami*, Fiziologhiia rastenii, 1958, **5**, 235.
6. Saakian R. G., *O nekotorîh biohimiceskie protessah u raznih po morozostoikosti sortov vinograda*, Fiziologhiia rastenii, 1959, **6**, 219.
7. Okunțov M. M., Aksenova O. F., *Osobennosti povedeniia dîhatelnoi sistemi pri zakalivanii rastenii*, Fiziologhiia ustoicivosti rastenii, I.A.N., SSSR, Moscova, 1960, 113.
8. Polușciuk L. K., *Zavisimosti zimostoikosti gretkogo oreha ot pogodnîh uslovii goda*, Fiziologhiia ustoicivosti rastenii, I.A.N., SSSR, Moscova, 1960, 366.
9. Andrews J. E., Roberts D. W. A., *Associations between ascorbic acid concentration and cold hardening in young winter wheat seedlings*, Canadian J. Bot., 1961, **39**, 503.
10. Mininberg S. Ia., *Morozostoikost i osobennosti obmena veșcestv vinograda pri razlicinîh usloviiah pitaniia*, Fiziologhia ustoicivosti rastenii, I.A.N., SSSR, Moscova, 1960, 327.
11. Ovcearov K. E., *Rolî vitaminov v jizni rastenii*, Moscova, Izd. Akad. Nauk SSSR, 1958, 286.
12. Soru E., *Biochimie medicală*, vol. I și II, Edit. medicală, București, 1959/1963.
13. Brad I., Laszlo Iulia, Valuță G., Sotiriu V., *Contribuții la stabilirea unor indici biochimici și fiziologici de rezistență la ger a cerealelor de toamnă*, St. cerc. biol., Seria Biologie vegetală, 1961, **XIII**, 233.
14. Ermakov A. I., Arasimovici V. V., Smirnova M. I., Muri I. K., *Metodî biohimiceskovo issledovannia rastenii*, Moscova-Leningrad, 1952.
15. Gstirner F., *Chemische physikalische Vitaminbestimmungsmethoden*, Stuttgart, 1951.
16. Walter O. A., Pinevici L. M., Varasova N. N., *Praktikum po fiziologhii rastenii s osnovami biohimii*, Moscova, 1957.
17. György P., *Vitamin methods*, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1950.
18. Kretovici V. L., *Bazele biochimiei plantelor*, trad., Edit. Acad. R.P.R., I.S.R.S., București, 1960.
19. Davidescu David, *Agrochimia*, ed. a 2-a, Edit. agrosilvică, București, 1963.
20. Fiziologhiia ustoicivosti rastenii, Trudî Konferenții 3—7 marta 1959, Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moscova, 1960.
21. Levitt J., *The hardiness of plants*, New York, 1956.
22. Bodea Cornel, *Tratat de biochimie vegetală*, Edit. Acad. R.P.R., București, 1964.
23. Soru Eugenia, *Biochimie medicală*, vol. I, ed. a II-a, Edit. medicală, București, 1959.
24. Witt P. R. jun., *Cooper and enzymatic oxidation of ascorbic acid, their relationship to amylase activity*. Amer. Soc. Brew. Chem., 1962, **47**, 53.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 177–179 (1965)

EXOSMOZA SODIULUI, POTASIULUI ŞI CALCIULUI DIN PIELEA UMANĂ NORMALĂ

MIOARA CÂRSTEANU

616.5 : 541.1

Rezumat. — Prin determinări conductometrice şi prin fotometrie de flacără s-a urmărit variaţia exosmozei sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană normală, în apă distilată şi în soluţii saline ale cationilor menţionaţi, în funcţie de concentraţiile soluţiilor şi de sex. Creşterea concentraţiei saline a soluţiei în care se produce exosmoza are ca efect diminuarea exosmozei pînă la procesul invers de endosmoză.

În lucrări anterioare [1], [2] s-a elaborat o metodă de urmărire a exosmozei electroliţilor din piele, care permite cercetarea unor aspecte ale biochimismului pielii în condiţii de structură intactă a materialului biologic viu. Cu această metodă s-a determinat exosmoza electroliţilor din pielea umană normală, precum şi în unele afecţiuni — ca eczeme, psoriazis etc. — stabilindu-se variaţia valorilor conductometrice ale soluţiilor în care s-a produs exosmoza.

Pentru a aprofunda acest proces de exosmoză a electroliţilor din piele, s-a urmărit şi studiat, într-o lucrare precedentă [3], influenţa hiperemiei experimentale, timpului şi temperaturii asupra exosmozei electroliţilor din pielea umană normală.

Deoarece pînă acum s-a studiat exosmoza globală a electroliţilor din pielea umană normală, era necesar să se urmărească şi exosmoza unor cationi mai importanţi în activitatea funcţională celulară, aceasta cu atît mai mult cu cît literatura de specialitate menţionează modificări ale echilibrului ionic din pielea umană în decursul unor maladii nespecifice, cum ar fi tuberculoza pulmonară, afecţiunile renale, afecţiunile cardiace, mixedemul, hipertiroidismul etc. [4].

În această lucrare am urmărit cum variază exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană normală *in situ*. Deoarece era de aşteptat ca exosmoza acestor ioni să depindă de natura soluţiei externe utilizate şi cum din literatură se ştie că ionii de potasiu şi de hidrogen influenţează schimburile de sodiu din pielea excizată de broască [5], am urmărit exosmoza cationilor menţionaţi în soluţiile lor saline, la diferite concentraţii şi la un pH acid. S-au stabilit totodată limitele acestor variaţii de exosmoză în raport cu sexul.

Metoda folosită a fost cea descrisă în lucrări anterioare [1] [2]. Ea prevede utilizarea unui cristalizor Jena cu diametrul de 4,5 cm şi o capacitate de 15 ml, care se umple pînă la marginea de sus cu apă distilată la temperatura camerei şi se aplică prin intermediul unei foiţe de plexiglas, pe suprafaţa pielii. O dată realizat contactul între tegument şi apa distilată din cristalizor, începe exosmoza electroliţilor din piele, care durează 15 minute, după care timp cristalizorul se îndepărtează. În soluţie se determină sodiul, potasiul şi calciul cu ajutorul unui fotometru de flacără Karl Zeiss-Jena, tip III, la o presiune de acetilenă de 20 ml apă, o presiune a aerului comprimat de 0,3 atm., o deschidere a diafragmei de 35 şi o sensibilitate a galvanometrului de 1x.

Determinările au fost făcute la temperatura camerei, la 26 de cazuri (12 bărbaţi şi 14 femei), pe antebraţ (piele normală, fără nici o afecţiune declarată clinic).

S-a urmărit în toate cazurile exosmoza sodiului, potasiului şi calciului în :

1) apă distilată, pH 5,3—5,6 ;

2) în soluţie cu pH 4,6—4,8 care conţinea clorură de sodiu în concentraţie de 0,05 mg% sodiu, clorură de potasiu în concentraţie de 0,05 mg potasiu, carbonat de calciu în concentraţie de 0,05 mg calciu, şi acid clorhidric concentrat 0,05 ml% ;

3) în soluţie cu pH 4,6—4,8 care conţinea clorură de sodiu în concentraţie de 0,1 mg% sodiu, clorură de potasiu în concentraţie de 0,1 mg% potasiu şi carbonat de calciu în concentraţie de 0,1 mg% calciu, acidulată cu acid clorhidric concentrat 0,05 ml% ;

4) în soluţie cu pH 4,6—4,8 care conţinea clorură de sodiu în concentraţie de 5,0 mg% sodiu, clorură de potasiu în concentraţie de 5,0 mg% potasiu şi carbonat de calciu în concentraţie de 5,0 mg% calciu, acidulată cu acid clorhidric concentrat 0,05 ml% ;

5) în soluţie cu pH 4,6—4,8 care conţinea clorură de sodiu în concentraţie de 8,0 mg% sodiu, clorură de potasiu în concentraţie de 8,0 mg% potasiu şi carbonat de calciu în concentraţie de 8,0 mg% calciu, acidulată cu acid clorhidric concentrat 0,05 ml%.

În tabela 1 sînt redate rezultatele care reprezintă limita inferioară şi cea superioară a valorilor conductometrice obţinute în urma exosmozei, atît la femei cît şi la bărbaţi, între care se încadrează toate celelalte rezultate.

Datele obţinute de noi pe pielea umană normală, neseparată de organismul viu, se deosebesc de cele aflate în literatură referitoare la comportarea pielei excizate de broască în soluţii saline de sodiu şi potasiu [6].

În condiţiile menţionate mai sus se constată că, în soluţiile cu salinitatea cea mai scăzută (0,05 mg%), exosmozează o cantitate de ioni mai mare decît în apa distilată. Exosmoza de sodiu şi potasiu atinge un maxim într-o soluţie de 0,05 mg% la femei şi de 0,1 mg% la bărbaţi. Cantitatea maximă de ioni de calciu exosmozează într-o soluţie de 0,05 mg% atît la femei cît şi la bărbaţi. Cu cît concentraţia soluţiei creşte, cu atît exosmoza scade pînă la zero, obţinîndu-se chiar un proces invers de endosmoză a ionilor respectivi.

Este de aşteptat ca aceste rezultate să servească în cercetările viitoare la interpretarea şi elucidarea fenomenului de exosmoză a sodiului, potasiului şi calciului în diferite boli ale pielei, urmînd să dea indicaţii referitoare la mecanismul unora din tratamentele utilizate azi în terapia afecţiunilor dermice.

Tabela nr. 1

Variaţiile exosmozei sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană normală, în raport cu sexul şi cu concentraţia salină a soluţiei în care se produce exosmoza

Sexul subiectului	Mediul de exosmoză				
	Apă distilată	Soluţie salină cu următoarea concentraţie (mg/100 ml) a fiecăruia din cationii folosiţi			
		0,05	0,1	5,0	8,0
		Exosmoză de sodiu (mg/100 ml)			
F	0,070	0,240	0,130	0,090	0,00
F	0,020	0,220	0,170	0,060	0,070 endosmoză
B	0,140	0,130	0,240	0,00	0,020 endosmoză
B	0,090	0,060	0,190	0,00	0,00
		Exosmoză de potasiu (mg/100 ml)			
F	0,00	0,430	0,240	0,110	0,090 endosmoză
F	0,00	0,460	0,260	0,260 endosmoză	0,020 endosmoză
B	0,170	0,200	0,320	0,380 endosmoză	0,020 endosmoză
B	0,290	0,140	0,380	0,00	0,00
		Exosmoză de calciu (mg/100 ml)			
F	0,050	0,290	0,220	0,00	0,240 endosmoză
F	0,060	0,300	0,180	0,030	0,155 endosmoză
B	0,090	0,120	0,100	0,00	0,080
B	0,070	0,100	0,070	0,00	0,00

Prezentată la redacţie la 21 ianuarie 1965

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, S. Comoroşan, *Cercetări conductometrice asupra exosmozei electroliţilor din piele*, St. cerc. chimie, **4**, 271 (1956).
2. E. Macovschi, S. Comoroşan, *Konduktometrische Untersuchungen der Elektrolytexosmose aus der Haut*, Ärztliche Forschung, **12**, 2 (1958).
3. Mioara Cârsteanu, *Influenţa hiperemiei experimentale, timpului şi temperaturii asupra exosmozei electroliţilor din pielea umană normală*, St. cerc. biochim., **6**, 255 (1963).
4. G. F. Rubino, L. Pettinati, G. Gerrato, G. Martina, *Cutaneous sodium and potasium in various morbid conditions*, Minerva Med., **49**, 3148 (1958).
5. W. R. Fleming, *The role of hydrogen ion and potasium ion in the active transport of sodium across the isolated frog skin*, J. Cellular Comp. Physiol., **49**, 129 (1957).
6. Mac Robbie, A. C. Enid, H. H. Ussing, *Osmotic behaviour of the epithelial cells of frog skin*, Acta Physiol. Scand., **53**, 349 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 181–185 (1965)

INTERACȚIUNEA CITOCROMULUI *C* CU FOSFOLIPIDELE TISULARE*

G. DINESCU și A. CURIGUȚ

616–006.6–092.9 : 577.158

Rezumat. — S-a urmărit acțiunea unor preparate solubile de fosfolipide extrase din țesuturi de șobolan (sarcom Jensen, carcinom Guérin, ficat și creier normal) asupra vitezei de oxidare și capacității de a fi redus a citocromului *c*. Oxidarea și reducerea s-au urmărit spectrofotometric utilizîndu-se ca agent de oxidare H_2O_2, iar de reducere ascorbatul.

Rezultatele arată că în prezența fosfolipidelor se produce o modificare a proprietăților enzimei, și anume: citocromul *c* devine autooxidabil în prezența H_2O_2; forma oxidată a citocromului *c* este redusă greu de către acidul ascorbic. Nu se observă diferențe semnificative între cele 4 tipuri de fosfolipide. Se consideră că modificarea proprietăților citocromului *c* în prezența fosfolipidelor poate avea importanță pentru celula canceroasă, aceasta avînd un conținut ridicat în fosfolipide și, probabil, urme de H_2O_2 liberă (datorită activității scăzute a catalazei), condiții care pot duce la denaturarea enzimei.

Interacțiunea acizilor grași și a altor lipide cu proteinele este cunoscută de mai multă vreme. Hardesty și Mitchel [1] au studiat influența pe care acizii grași o exercită asupra citocromului *c*, iar Negelein și colab. [2] au arătat că oxidarea citocromului *c* redus este puternic inhibată în prezența acizilor grași.

În lucrarea de față am urmărit interacțiunea fosfolipidelor cu citocromul *c*, ținînd seama de faptul că aceste lipide au un rol deosebit de important în transportul de electroni, activitatea enzimatică a mitocondriilor depinzînd de prezența moleculelor de fosfolipide intacte.

În general, țesuturile care conțin o cantitate mare de fosfolipide prezintă și o activitate foarte crescută a enzimelor respiratorii (în ordine descrescîndă : inimă, rinichi, ficat, creier etc.); se constată însă că țesuturile tumorale, deși au un conținut ridicat în fosfolipide (după majoritatea autorilor cantitatea de fosfolipide din tumori este mai mare decît cea din țesuturile normale de origine), se caracterizează printr-o activitate foarte scăzută a enzimelor respiratorii. Determinări spectrofotometrice făcute de Chance și colab. [3] au arătat că, cel puțin în cazul celulelor de ascită Ehrlich, nu este vorba de scăderea cantității de citocromi

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 2 (1965), în limba engleză.

a, *b* şi *c* faţă de celulele normale, ci de o reducere importantă a activităţii lor catalitice.

Aceste date, care sugerează că în ţesuturile tumorale se modifică proprietăţile enzimelor din lanţul respirator, ne-au făcut să urmărim acţiunea unor preparate solubile de fosfolipide extrase din ţesuturi (tumori, ficat, creier) asupra vitezei de oxidare şi capacităţii de a fi redus a citocromului *c*.

MATERIAL ŞI METODĂ

Enzimă. S-a utilizat citocrom *c* Fluka (preparat din inimă de cal); s-a lucrat cu o soluţie de citocrom *c* în concentraţie de 0,02 mM (considerînd o greutate moleculară de 16000 a enzimei), preparată în tampon Tris 0,05 M, pH 8,6.

Fosfolipide. S-au extras lipidele totale din sarcom Jensen, carcinom Guérin, ficat şi creier de şobolan normal prin metoda Folch [4]. Fosfolipidele s-au separat prin cromatografie pe coloană de acid silicic, după metoda Hirsh şi Ahrens [5]; s-a utilizat acid silicic Mallinckrodt 100 mesh (tipul Ramsey şi Patterson). Fosforul lipidic s-a determinat prin metoda Bartlett [6], iar conţinutul în fosfolipide s-a calculat considerîndu-se o greutate moleculară medie de 750; extractele obţinute conţin aprox. 90% fosfolipide. În tot timpul preparării s-a evitat contactul probelor cu aerul şi cu lumina, pentru a se înlătura riscul peroxidării lipidelor.

Soluţiile apoase de fosfolipide s-au preparat prin metoda Fleischer şi Klouwen [7], în felul următor: fosfolipidele se dizolvă într-o soluţie de butanol-dezoxicolat de sodiu 20% în proporţie de 87/13 (V/V) şi apoi se dializează faţă de o soluţie de Tris-acetat 0,02 M şi EDTA 0,001 M, pH 8, timp de 7 zile la 5°C (lichidul de dializă fiind schimbat zilnic). Soluţia astfel obţinută, după filtrare, prezintă o opalescenţă foarte scăzută, care nu deranjează determinările spectrofotometrice.

S-au preparat cîte 5 probe din fiecare tip de ţesut, efectuîndu-se 5 determinări cu fiecare probă.

Mod de lucru. Oxidarea citocromului *c* s-a determinat spectrofotometric, urmărindu-se extincţia soluţiei de citocrom *c* la lungimea de undă corespunzătoare bandei Soret a enzimei oxidate (407 mμ) [1]. În cuvele de 0,5 cm s-au introdus 1,75 ml soluţie de citocrom *c* şi 0,25 ml soluţie fosfolipidică (2 mg fosfolipide/probă); după agitare, probele s-au lăsat 15—30 de minute la temperatura camerei, apoi s-au adăugat rapid 0,05 ml H_2O_2 1% (preparată din soluţia Merck, 30%); citirile s-au făcut la 2 minute, timp de 10 minute.

Reducerea citocromului s-a făcut cu o soluţie 5% de ascorbat (Reanal) în tampon Tris, pH 8,6; s-a determinat raportul dintre forma redusă (550 mμ) şi cea oxidată (565 mμ) a citocromului, înainte şi după reducere [8]. Amestecul de reacţie a constat din 1,75 ml soluţie de citocrom *c*, 0,25 ml soluţie fosfolipidică şi 0,1 ml ascorbat; citirea s-a făcut imediat după adăugarea agentului reducător. S-a utilizat spectrofotometrul universal Zeiss.

REZULTATE

Oxidarea citocromului c în prezenţă de H_2O_2. Figura 1 ilustrează scăderea extincţiei la 407 mμ a soluţiei de citocrom *c*, şi în prezenţa fosfolipidelor, produsă de peroxidul de hidrogen.

După cum se constată, valorile iniţiale sînt de acelaşi ordin de mărime cu ale martorului, ceea ce arată opalescenţa extrem de redusă a soluţiei

de fosfolipide. Adăugarea peroxidului de hidrogen nu modifică decît foarte puțin extincția citocromului *c* singur; în schimb se produce o scădere bruscă a extincției în prezența fosfolipidelor. Nu se observă diferențe mari între curbele obținute în prezența fosfolipidelor din ficat, creier, sarcom Jensen și carcinom Guérin; sensibilitatea citocromului *c* la oxidare este minimă în prezența fosfolipidelor hepatice și maximă în prezența celor din carcinom Guérin.

Reducerea citocromului c cu ascorbat. Rezultatele arată că fosfolipidele produc nu numai creșterea sensibilității citocromului *c* la acțiunea peroxidului de hidrogen, ci și o scădere a capacității lui de a fi redus de către agenții reducători. Din figura 2 se observă că, înainte de adăugarea ascorbatului, *R* (raportul dintre forma redusă și cea oxidată) are valori aproximativ egale la martor și la probele cu lipide, fapt care demonstrează că soluțiile de lipide nu sînt peroxidate. După adăugarea acidului ascorbic se observă o creștere pronunțată a lui *R* la martor; la probele conținînd fosfolipide *R* crește de asemenea, dar în proporție mult mai mică, ceea ce arată o scădere a capacității citocromului *c* de a fi redus. Se observă că reducerea citocromului *c* scade cel mai mult în prezența fosfolipidelor din carcinom Guérin.

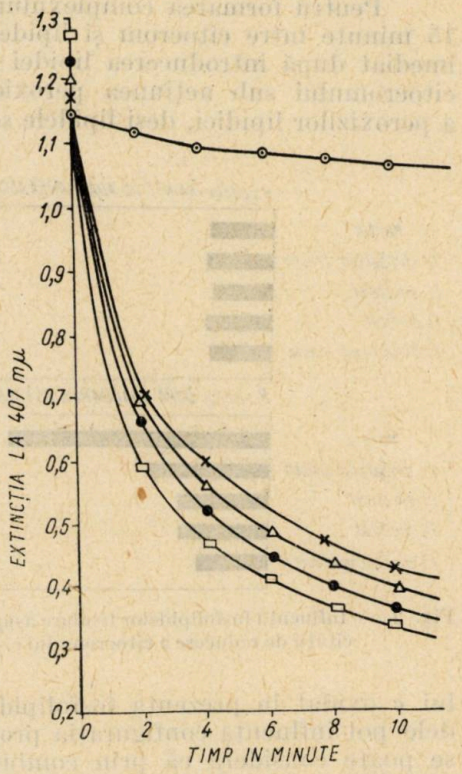


Fig. 1. — Efectul H_2O_2 asupra citocromului *c* în prezența și absența fosfolipidelor tisulare.
⊙–⊙ Martor
●–● F.L. din sarcom Jensen
×–× F.L. din ficat
△–△ F.L. din creier
□–□ F.L. din carcinom Guérin

DISCUȚII

Studiindu-se rolul lipidelor în transferul de electroni și în fosforilarea oxidativă, s-a constatat că proteinele se combină cu fosfolipidele prin intermediul unei legături cu caracter ionic; Green și Fleischer [9] au arătat că între citocromul *c* al mamiferelor (proteină bazică) și fosfolipide (care au caracter acid) se stabilește o astfel de legătură.

Rezultatele noastre sînt în concordanță cu aceste date; ele demonstrează formarea unui complex citocrom *c*-fosfolipide; fosfolipidele extrase din țesuturi se combină cu enzima, modificîndu-i proprietățile, și anume:

1. Citocromul *c*, care nu este autooxidabil și rezistă la acțiunea peroxidului de hidrogen între pH 4 și 12, devine, în prezența fosfolipidelor, extrem de sensibil la acțiunea H_2O_2.

2. Soluţiile de citocrom *c* sînt reduse rapid de către ascorbat ($R > 6$); în prezenţa fosfolipidelor se observă însă că reducerea formei oxidate se face mult mai greu. Valoarea lui R scade sub 3 în prezenţa lipidelor, indiferent de provenienţa lor.

Pentru formarea complexului este necesar un contact de cel puţin 15 minute între citocrom şi lipide; adăugarea H_2O_2 sau a ascorbatului imediat după introducerea lipidei este lipsită de eficacitate. Distrugerea citocromului sub acţiunea peroxidului nu se datoreşte acţiunii toxice a peroxizilor lipidici, deşi lipidele se peroxidează extrem de uşor; în cazul de faţă timpul de reacţie este prea scurt pentru peroxidarea lipidelor. În cazul reducerii cu ascorbat, trebuie reţinut faptul că nu e vorba de o peroxidare a lipidelor cu ascorbat în prezenţa ionilor de Fe^{3+}; pentru o astfel de reacţie este necesară incubarea probelor la 37° timp de o oră. În condiţiile noastre de lucru, raportul dintre forma redusă şi cea oxidată se determină imediat după adăugarea ascorbatului, pentru a se evita posibilitatea formării peroxizilor lipidici, aşa că rezultatele exprimă o inhibare a reducerii citocromului *c* oxidat în prezenţa fosfolipidelor. Ţinînd seama de faptul că lipidele pot influenţa configuraţia proteinei enzimatice cu care se asociază, se poate considera că prin combinarea catenelor ciclului porfirinic cu grupările acide ale fosfolipidelor hemul devine mai expus la acţiunea agenţilor oxidanţi şi reducători.

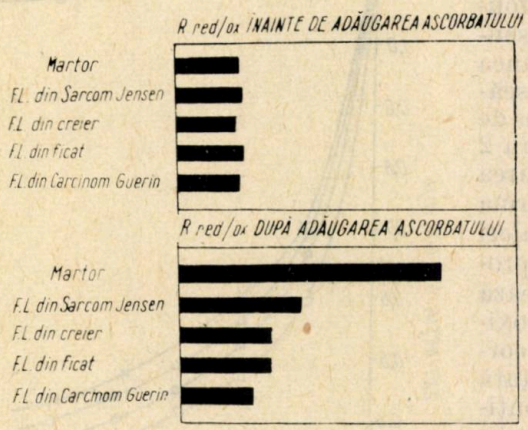


Fig. 2. — Influenţa fosfolipidelor tisulare asupra capacităţii de reducere a citocromului *c*.

Veerkamp şi colab. [10] au arătat că fosfolipidele posedă o oarecare specificitate de ţesut; din rezultatele noastre rezultă că există diferenţe în comportarea citocromului *c* combinat cu diferitele fosfolipide utilizate, dar aceste diferenţe nu sînt foarte pronunţate.

Modificarea proprietăţilor citocromului *c* în prezenţa fosfolipidelor poate avea importanţă pentru celula canceroasă, care are un conţinut ridicat de fosfolipide; activitatea scăzută a catalazei din tumori face probabilă existenţa urmelor de H_2O_2 nedescompuse, care să producă denaturarea citocromului *c*. Reducerea dificilă a citocromului *c* oxidat duce la perturbarea transferului de electroni şi deci la scăderea activităţii citocromoxidazei.

Institutul oncologic, Bucureşti

Prezentată la redacţie la 14 ianuarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. B. Hardesty, H. Mitchel, *The interaction of fatty acids with mammalian cytochrome c*, Arch. Biochem. Biophys., **100**, 1 (1963).
2. E. Negelein, R. Schön, K. Menke, *Über die Hemmung der $NADH_2$ — Oxydation in Mitochondrien. Präparaten durch Fettsäuren*, Acta biol. med. Germ., **10**, 513 (1963).
3. B. Chance, B. Hess, *Metabolic control mechanisms. Electron transfer in the mammalian cell*, J. biol. Chem., **234**, 2 404 (1959).
4. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*, J. biol. Chem., **226**, 497 (1957).
5. J. Hirsh, E. Ahrens, *The separation of complex lipide mixtures by the use of silicic acid chromatography*, J. biol. Chem., **233**, 311 (1958).
6. G. Bartlett, *Phosphorus assay in column chromatography*, J. biol. Chem., **234**, 466 (1959).
7. S. Fleischer, H. Klouwen, *The role of soluble lipid in mitochondrial enzyme systems*, Biochem. Biophys. Res., Commun., **5**, 378 (1961).
8. G. K. Paul, *The spectroscopic determination of cytochrome c*, Arch. Biochem. **12**, 441 (1947).
9. D. E. Green, S. Fleischer, *The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphoxylation*, Biochem. Biophys. Acta, **70**, 554 (1963).
10. J. Veerkamp, I. Mulder, L. van Deenen, *Comparative studies on the phosphatides of normal rat liver and primary hepatoma*, Z. Krebsforsch., **64**, 137 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 187–191 (1965)

ACȚIUNEA ENDOXANULUI ASUPRA CONȚINUTULUI ÎN LIPIDE A UNOR TUMORI EXPERIMENTALE

G. DINESCU și P. TĂUTU

616–006–092.9 : 615.771.7

Rezumat. — Se studiază variația conținutului în lipide și fosfolipide totale, comparativ, pe tumori sensibile la citostatic (sarcoame Jensen, Yoshida) și pe o tumoare rezistentă (carcinosarcom Guérin). De asemenea, s-a determinat conținutul în lipide în ficat și mucoasa intestinală provenite de la animale normale tratate cu endoxan.

În tumorile sensibile la citostatic fosfolipidele scad în medie cu 30%; în tumoarea Guérin, în ficat și în mucoasa intestinală nu se observă modificări.

Rezultatele sînt discutate în legătură cu mecanismul de acțiune al substanțelor citostatice.

Metabolismul lipidic al tumorilor formează un capitol relativ puțin studiat; lucrările din ultimii ani care au demonstrat importanța lipidelor — în special a fosfolipidelor — pentru membrana celulară și structura mitocondriilor au stimulat studiile asupra metabolismului lipidic și compoziției în fosfolipide a țesuturilor tumorale [1], [2]. S-a arătat că celulele canceroase intacte conțin o cantitate mare de lipide și că tumorile sînt, în general, mai bogate în fosfolipide decît țesuturile normale de origine [3].

Fosfolipidele prezintă o importanță deosebită pentru activitatea enzimatică a mitocondriilor, aceasta depinzînd de prezența moleculelor lipidice intacte. Pornind de la faptul că activitatea enzimelor respiratorii este inhibată de substanțele citostatice [4], în lucrarea de față s-a urmărit dacă această inhibiție nu se produce prin intermediul metabolismului lipidic. În acest scop s-a determinat variația conținutului în lipide și fosfolipide totale în unele tumori experimentale și țesuturi normale, provenite de la animale tratate cu endoxan.

Studiul s-a efectuat pe sarcom Jensen și tumoare Yoshida grefată intraperitoneal, sensibile la endoxan, precum și pe sarcom Guérin, puțin influențat de acest citostatic. Determinările s-au făcut în ziua a 8-a de la începerea tratamentului, deoarece acest moment coincide, în general, cu începutul inhibiției tumorale.

MATERIAL SI METODĂ

Animale. S-au utilizat şobolani purtători de sarcom Jensen, carcinom Guérin şi tumoare Yoshida grefată intraperitoneal după tehnica laboratorului de farmacodinamie al Institutului oncologic din Bucureşti. Animalele au fost injectate intravenos cu o doză unică de endoxan (70 mg/kg), administrată în a 10-a zi de la grefare. Animalele au fost sacrificate în a 8-a zi de la tratarea cu citostatic.

S-a determinat de asemenea conţinutul în lipide din ficatul şi mucoasa intestinală provenite de la animale normale.

Metode. Lipidele totale s-au extras prin metoda Folch [5], cu cloroform-metanol 2 :1. Spălarea extractelor s-a făcut prin metoda Folch; conţinutul în lipide totale s-a determinat gravimetric, prin tehnica descrisă de Sperry [6].

Fosforul lipidic s-a dozat prin metoda Bartlett [7]; conţinutul în fosfolipide s-a calculat din conţinutul în fosfor lipidic, utilizînd o greutate moleculară arbitrară de 750 (medie a distearil-fosfatidil-etanolaminei şi distearil-lecitinei) [8].

Semnificaţia diferenţei dintre loturi a fost calculată prin testul t (în condiţia $S_1 \neq S_2$ şi $n_1 \neq n_2$) [9].

REZULTATE

Rezultatele arată că sub acţiunea endoxanului se produce o scădere a conţinutului tumorilor în lipide totale şi în special în fosfolipide.

1. *Lipidele totale* (tabela nr. 1) prezintă o scădere uşoară numai în cazul sarcomului Jensen; nu se observă modificări semnificative ale conţinutului în lipide totale din tumoarea Yoshida, carcinom Guérin, ficat şi mucoasă intestinală.

2. *Fosfolipidele* scad în sarcoamele Jensen (31, 8%) şi Yoshida (32%) provenite de la animalele tratate cu endoxan; diferenţele au semnificaţie statistică. În cazul carcinomului Guérin nu se observă modificări ale cantităţii de fosfolipide (tabela nr. 2).

Conţinutul în fosfolipide din ficat şi mucoasa intestinală nu este influenţat de tratamentul cu citostatic.

DISCUŢII

Faptul că substanţele chimioterapice influenţează metabolismul lipidic al organismului a fost pus în evidenţă pentru prima oară de Thiele (citat după [10]), care a arătat că sub acţiunea unui stress mare de iradiere sau prin azot-iperite se observă o creştere pronunţată a plasmalogenului din ser.

Acţiunea agenţilor chimioterapici asupra lipidelor din tumori transplantabile a fost studiată de Holzinger [10], care a demonstrat pe cale histochimică că degranolul, podofilina şi colcemida produc scăderea acetalfosfolipidelor, lipidelor neutre şi nesaturate din sarcom 180 (Crocker).

Rezultatele noastre arată scăderea concentraţiei de lipide totale şi fosfolipide în sarcoamele Jensen şi Yoshida, tumori foarte sensibile la endoxan; din contră, carcinomul Guérin, puţin influenţat de acest cito-

Tabela nr. 1

Variaţia conţinutului în lipide totale în ţesuturi de şobolani trataţi cu endoxan *

Ţesutul	Lotul	% ţesut umed				% ţesut uscat			
		n	$\bar{x}$	s^2	P	n	x	s^2	P
Carcinom Guérin	control	5	2,39	0,20	P<0,05	5	14,58	0,24	P<0,05
	tratat	8	2,56	0,09		8	15,62	1,71	
Sarcom Jensen	control	12	2,73	0,46	P<0,05	12	16,00	2,68	P>0,05
	tratat	11	2,30	0,47		11	13,24	2,56	
Tumoare Yoshida	control	5	4,52	0,46	P<0,05	5	21,26	2,18	P<0,005
	tratat	5	4,42	1,37		5	24,60	5,02	
Ficat	control	11	4,50	0,72	P<0,05	11	18,58	3,60	P<0,05
	tratat	11	4,26	0,33		11	17,70	2,00	
Mucoasă intestinală	control	7	2,85	0,72	P<0,05	7	16,85	2,89	P<0,05
	tratat	9	2,83	0,53		9	16,14	2,54	

* Cifrele reprezintă mg de lipide totale la 100 mg de ţesut umed, respectiv de ţesut uscat.
n = numărul de animale din lot;
$\bar{x}$ = media aritmetică a rezultatelor;
s^2 = varianţa.

Tabela nr. 2

Variaţia conţinutului de fosfolipide totale în ţesuturi de şobolani trataţi cu endoxan *

Ţesutul	Lotul	% lipide totale				% ţesut uscat			
		n	$\bar{x}$	s^2	P	n	$\bar{x}$	s^2	P
Carcinom Guérin	control	5	41,32	7,38	P<0,05	5	6,31	1,67	P < 0,05
	tratat	5	41,18	6,83		5	6,04	0,73	
Sarcom Jensen	control	12	42,72	6,22	P>0,01	12	6,88	1,57	P>0,01
	tratat	11	29,22	8,00		10	4,81	1,44	
Tumoră Yoshida	control	5	42,13	3,24	P>0,01	5	7,13	1,25	P=0,05
	tratat	5	28,26	6,47		5	5,46	0,64	
Ficat	control	9	58,99	4,91	P<0,05	8	10,30	0,76	P<0,05
	tratat	10	56,59	6,43		10	9,66	1,50	
Mucoasă intestinală	control	10	20,87	9,65	P<0,05	6	3,80	0,94	P<0,05
	tratat	10	19,77	8,78		9	3,41	0,66	

* Aceeaşi legendă ca la tabela nr. 1.

static, nu prezintă modificări. Acest fapt concordă de altfel cu observațiile lui Hagony [11], care nu a putut pune în evidență modificări ale cantității de fosfor lipidic din tumoarea Guérin tratată cu degranol (citostatic cu acțiune mult mai slabă decît endoxanul).

Faptul că în ficat conținutul în lipide și fosfolipide totale nu este influențat de endoxan se explică prin aceea că ficatul, fiind un organ radiorezistent, se comportă asemănător față de substanțele radiomimetice.

Scăderea conținutului în lipide tisulare sub acțiunea substanțelor anticanceroase poate fi datorită mai multor factori, și anume :

1. Scăderii sintezei de lipide totale și de fosfolipide ; Visser (citat după [12]) a arătat că antimetabolitul *2,6*-diaminopurina reduce încorporarea ^{32}P în lipidele din hepatom, iar Mandel (citat după [12]) a observat că *6*-mercaptopurina inhibă încorporarea acetatului în lipide la concentrații mai scăzute decît cele la care interferează cu sinteza acizilor nucleici.

2. Dezintegrării celulare rapide care apare după administrarea agenților chimioterapici, ceea ce face ca lipidele să nu mai aibă timp să se depună [10] ; reducerea cantității de fosfolipide se datorește, probabil, leziunilor grave suferite de celulele intacte sub acțiunea endoxanului.

Din rezultatele obținute se observă că scăderea fosfolipidelor este caracteristică numai celulelor tumorale sensibile la endoxan, și nu se produce în alte celule ; acest lucru trebuie pus pe seama faptului că, sub acțiunea agenților citostatici, are loc o scădere a activității celulare a tumorilor și se știe că, în general, scăderea activității celulare este însoțită de scăderea fosfolipidelor.

Se știe că permeabilitatea diferitelor tipuri de celule pentru una și aceeași substanță este foarte variabilă, deoarece celulele au structuri și funcții diferite ; acest lucru explică motivul pentru care substanțele chimice nu se dispersează uniform în organism [14]. Ținînd seama de rolul pe care fosfolipidele îl joacă în fenomenele de permeabilitate celulară, acțiunea diferită a endoxanului asupra tumorilor și țesuturilor normale s-ar putea explica printr-o creștere a permeabilității celulelor tumorale la citostatic, ca urmare a scăderii conținutului în fosfolipide.

Reducerea conținutului în fosfolipide are o serie de consecințe importante pentru celula tumorală, și anume :

a) Fosfolipidele au rolul fiziologic de „transportor" în transferul ionilor prin membrana celulară ; reducerea cantității lor poate avea ca rezultat alterarea permeabilității membranelor celulare.

b) Poate reprezenta o cale prin care substanțele anticanceroase influențează enzimele respiratorii, a căror activitate este strîns legată de fosfolipidele mitocondriale.

c) Date recente [13] au arătat că fosfolipidele participă în sinteza proteică (încorporarea aminoacizilor în proteine se face prin intermediul complexelor cu fosfolipidele) ; scăderea conținutului în fosfolipide ar putea constitui deci un factor suplimentar care să explice perturbarea metabolismului proteic sub acțiunea citostaticelor.

Institutul oncologic, București

Prezentată la redacție la 8 decembrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. G. Kögl, G. Snak, J. Veerkamp, L. van Deenen, *Metabolism and functions of phosphatides; investigations on the phosphatides of some experimental tumours*, Z. Krebsforsch., **63**, 558 (1960).
2. J. Veerkamp, J. Mulder, L. van Deenen, *Comparative studies on the phosphatides of normal rat liver and primary hepatoma*, Z. Krebsforsch., **64**, 137 (1961).
3. F. Haven, W. R. Bloor, *Lipids in cancer*, Adv. in Canc. Res., **4**, 237 (1956).
4. I. Kițulescu, G. Dinescu, *Relația dintre enzimologie și chimioterapia cancerului*, Rev. Oncol. Radiol., **2**, 201 (1963).
5. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*, J. biol. Chem., **226**, 497 (1957).
6. W. Sperry, *Lipide analysis*, în *Methods in biochemical analysis*, sub redacția D. Glick, Interscience Publ., N. Y., **2**, 83, 1961.
7. G. Bartlett, *Phosphorus assay in column chromatography*, J. biol. Chem. **234**, 466 (1959).
8. L. Biran, W. Bartley, *Distribution of fatty acids in lipids of rat brain, brain mitochondria and microsomes*, Biochem. J., **79**, 159 (1961).
9. G. W. Snedecor, *Statistical methods applied to experiments in Agriculture and Biology*, Yowa State Univ. Press, Ames, 1962, p. 98.
10. L. Holzinger, *The effect of chemotherapeutic agents on the lipids of transplantable tumours*, Acta U.I.C.C., **16**, 662 (1960).
11. P. Hagony, M. Jaky, *Changes in the lipid composition of tumor and hepatic tissue of rats bearing Guérin carcinoma following treatment with degranol*, Biochem. Pharmacol., **5**, 46 (1960).
12. J. Biesele, *Mitotic poisons and the cancer problem*, Elsevier Publ. Comp., 13 și 134 (1958).
13. W. Gaby, H. Wolin, I. Zajac, *The role of phospholipides in the uptake of aminoacids by Ehrlich ascites carcinoma cells*, Can. Res., **20**, 1508 (1960).
14. Z. Bacq et al. *Pharmacodynamie biochimique*, ed. II, Masson et Comp., Paris, 1961, p. 49.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 193–198 (1965)

IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA UNOR ALCALOIZI DIN *THALICTRUM MINUS* L. VAR. *ELATUM* (JACK) SCHINZ ET KELL*.

AUREL GHEORGHIU, ELENA IONESCU-MATIU şi VASILE CALCANDI

547.94 : 582.675.1

Rezumat. — În părţile subterane uscate ale speciei *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack/Schinz et Kell), s-a găsit un conţinut în alcaloizi totali de 0,8320 g% care, în părţile aeriene a fost de 0,4676 g%, iar în frunze de 0,6160 g%.

Prin cromatografia pe hîrtie s-au separat din părţile subterane trei spoturi alcaloidice, dintre care două corespund ca valoare Rf berberinei şi aconitinei folosite ca martor, iar din frunze patru spoturi alcaloidice, dintre care al patrulea spot are aceeaşi valoare Rf ca aconitina şi nici unul dintre spoturi nu a corespuns ca valoare Rf şi fluorescenţă berberinei folosite ca martor.

Din părţile subterane s-au extras, izolat şi purificat doi alcaloizi cristalizaţi, cu formulele chimice brute, ca şi alte proprietăţi fizico-chimice, asemănătoare aconitinei şi berberinei.

Thalictrum minus L. din familia *Ranunculaceae* este o plantă folosită în medicina populară din diferite ţări.

Lecoyer [11] semnalează, în 1885, că, în partea de sud a Uniunii Sovietice, rădăcinile acestei specii constituie un remediu popular la muşcăturile de viperă. Watt şi Breyer-Brandwijt [18] au arătat că, în Africa de Sud, *Thalictrum minus* L. este folosită în popor contra febrei. Sekiguchi [15] indică faptul că *Thalictrum thunbergii* D.C., sinonim cu *Thalictrum minus* L. var. *hypoleucum* Sieb. et Zucc., este întrebuinţat în Japonia ca remediu în durerile de stomac şi contra diareii.

Întrebuinţarea acestei specii din genul *Thalictrum* în medicina populară a trezit interesul fitochimiştilor, care au întreprins cercetări laborioase în scopul cunoaşterii alcaloizilor responsabili în cea mai mare parte de acţiunea terapeutică.

În 1956, Oysepian [14] a constatat că extractele provenite de la *Thalictrum minus* L. prezintă efecte fiziologice asupra inimii, iar totalul alcaloizilor extraşi sub formă de clorhidrat exercită o acţiune farmacologică asupra presiunii arteriale şi pulsului la broaşte, pisici şi cîini. Junussov

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2 2, (1965), în limba franceză.

şi Progressov [10], făcînd cercetări asupra alcaloizilor totali din părţile aeriene de *Thalictrum minus* L., au izolat thalmina $C_{20}H_{23}O_3N$ şi thalmidina $C_{21}H_{25}O_4N$, iar din conţinutul de alcaloizi totali provenit din părţile subterane au separat thalicmina $C_{21}H_{25}O_5N$, thalicmidina $C_{20}H_{25}O_4N$ şi un alcaloid cu p.t. 243°. Fujita şi Tomimatşu [2—5], au izolat din părţile subterane provenite de la *Thalictrum thunbegii* D.C., sinonim cu *Thalictrum minus* var. *hypoleucum* Sieb. et Zucc., magnoflorina $C_{20}H_{24}O_4N$ şi thalictuberina $C_{21}H_{23}O_4N$, iar din părţile aeriene magnoflorina, takatonina $(C_{21}H_{24}O_4N)OH$, thalicberina $C_{37}H_{40}O_6N_2 \cdot H_2O$ şi *O*-metil-thalicberina $C_{38}H_{42}O_6N_2$. Fujita, Tomimatsu şi Kano [6], [7] au stabilit structura chimică a thalicberinei şi o-metil-thalicberinei şi au obţinut din părţile subterane ale aceleiaşi specii thalicrina, un alcaloid fenolic, cristalizat în ace incolore $C_{36}H_{38}O_6N_2$, şi un alcaloid nefenolic, homothalicrina $C_{37}H_{40}O_6N_2$, în cristale cubice incolore. Tomimatsu şi colab. [17] au stabilit structura chimică a thalicrinei şi homotalicrinei. Nakajima [13], făcînd cercetări asupra speciei *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack/ Schinz et Kell), folosită de asemenea în medicina populară, a izolat din extractul eteric un alcaloid pe care l-au numit elatrina $C_{40}H_{56}O_6N_3$, sub formă de cristale aciculare, şi un alcaloid fenolic neidentificat. Tomimatsu, Matsui, Uji şi Kano [17], făcînd cercetări asupra speciei *Thalictrum thunbergii* D.C., colectată din diferite regiuni din Japonia, au constatat că atît cantitatea, cît şi calitatea conţinutului în alcaloizi variază, fiind condiţionate de locul şi regiunea unde această specie creşte.

Întrucît *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack) Schinz et Kell. creşte în flora noastră spontană şi este folosită în medicina populară, cercetările noastre au fost îndreptate asupra acestei specii.

MATERIAL ŞI METODE

Materialul a fost colectat din Pădurea Pasărea, din jurul Bucureştiului, şi determinat sistematic [1]. Pentru studiul microscopic, o parte din materialul proaspăt a fost păstrat în alcool 70%, iar cea mai mare parte a fost uscat într-un pod bine aerisit.

Pentru determinarea conţinutului în alcaloizi totali, s-au luat 10 g de produs vegetal (părţi subterane) dintr-un lot căruia în prealabil i s-a stabilit gradul de umiditate şi s-au supus vibroextracţiei cu o soluţie de acid formic 1%, timp de 30 de minute, folosindu-se vibroextractorul F. S., aparat construit de Ionescu-Stoian şi colaboratori [9]. După filtrare, soluţia a fost alcalinizată cu amoniac şi extrasă cu cloroform. Cloroformul a fost distilat la volum mic, sub presiune redusă, iar soluţia s-a acidulat cu acid formic 1%. După îndepărtarea urmelor de cloroform, soluţia s-a filtrat, iar alcaloizii totali au fost precipitaţi cu reactiv Bertrand. Totalul de alcaloizi a fost exprimat în berberină.

Aceeaşi tehnică a fost folosită şi pentru determinarea cantitativă a conţinutului în alcaloizi totali din părţile aeriene.

Pentru examenul cromatografic, s-au luat 100 g de produs vegetal (părţi subterane), care au fost pulverizate şi extrase cu o soluţie de acid formic 1% prin vibroextracţie, timp de

[1] Mulţumim prof. dr. Traian Ştefureac, de la catedra de sistematică vegetală a Universităţii din Bucureşti, pentru identificarea materialului.

30 de minute. După filtrare, soluția a fost concentrată la volum mic, sub presiune scăzută, alcalinizată și extrasă cu cloroform în repetate rînduri. Soluția cloroformică s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru, iar cloroformul s-a distilat sub presiune redusă. Reziduul a fost luat cu 3 ml acid formic 1% (soluția A).

Aceleași operații de extracție au fost făcute și pentru 100 g frunze pulverizate. Alcalinizarea soluției s-a făcut însă mai întîi cu bicarbonat de sodiu pînă la pH8, apoi s-a extras cu eter etilic (soluția B), după care soluția inițială s-a alcalinizat mai departe cu hidroxid de sodiu și s-a extras cu cloroform (soluția C).

Soluțiile apoase A, B, C, cu alcaloizii sub formă de săruri (formiați), au fost supuse examenului cromatografic.

Pentru separarea și identificarea alcaloizilor s-a folosit tehnica cromatografică descendentă pe hîrtie Schleicher-Schüll 2043 b. În acest scop s-au întrebuințat următoarele sisteme de solvenți : I) acetat de etil-piridină-apă 75 :31 :16,5 ; II) butanol-amoniac-apă 35 :5 :1 ; III) propanol-amoniac-apă 4 :2 :1 [1] ; IV) butanol-acid acetic-apă 4 :1 :5 [8]. Punerea în evidență a alcaloizilor s-a făcut cu reactivul Dragendorff modificat [8].

Pentru extragerea, izolarea, purificarea și identificarea unor alcaloizi din această specie s-a folosit următoarea metodă :

1970 g de produs vegetal (părți subterane), uscat și pulverizat, a fost supus în loturi mici vibroextracției cu o soluție de acid tartric 5%. Extractul a fost concentrat sub presiune redusă pînă la un reziduu siropos, care a fost diluat cu apă și lăsat în repaus. După filtrare soluția a fost tratată de cîteva ori cu eter etilic, prin agitare, alcalinizată cu bicarbonat de sodiu și extrasă cu eter etilic. Soluția eterică s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru și s-a distilat. Reziduul s-a dizolvat în soluție de acid tartric 5%, s-a spălat cu eter etilic, s-a alcalinizat cu bicarbonat de sodiu și s-a extras cu eter etilic. Soluția eterică s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-a concentrat prin distilare la volum mic și s-a adăugat eter de petrol. După 24 de ore, la temperatura de + 5°C s-a depus o substanță cristalizată (a). Pentru purificare substanța (a) a fost trecută în perclorat și apoi din nou în bază liberă, care a cristalizat din alcool.

Apele mame de la separarea alcaloidului (a) au fost reunite și concentrate sub presiune redusă pînă la uscare. Reziduul a fost luat cu etanol la cald. Extractul etanolic, concentrat pînă la un volum de circa 50 ml, sub presiune redusă, s-a răcit la 5°C și s-a tratat cu o soluție alcoolică de acid clorhidric 1% pînă la reacție acidă (roșu de Congo). După un repaus de cîteva ore la 5°C, precipitatul separat s-a spălat cu alcool absolut, s-a dizolvat în apă la cald și s-a agitat cu cărbune. Soluția filtrată la cald și lăsată 24 de ore la 5°C a depus cristale aciculare galbene [b].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinările cantitative efectuate asupra diferitelor părți uscate ale plantei *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack)Schinz et Kell. ne-au arătat că părțile subterane au un conținut de 0,8320 g% alcaloizi totali exprimat în berberină, părțile aeriene 0,4676 g%, iar frunzele 0,6160 g%. Pentru fiecare dintre acestea s-au făcut cel puțin trei determinări cantitative.

Din rezultatele obținute se constată că părțile subterane au un conținut mai mare în alcaloizi.

Prin cromatografia descendentă pe hîrtie, s-a putut separa din părțile subterane ale acestei specii un spot alcaloidic care prezintă, în cele

patru sisteme de solvenţi folosite, aceeaşi valoare Rf şi aceeaşi fluorescenţă ca berberina folosită ca martor. În cazul folosirii sistemelor de solvenţi I şi III s-au putut separa trei spoturi alcaloidice, dintre care unul are aceeaşi valoare Rf şi fluorescenţă ca berberina, iar al treilea spot are acelaşi Rf ca şi aconitina folosită ca martor (fig. 1).

Aplicînd aceeaşi tehnică cromatografică în aceleaşi condiţii de lucru şi asupra extractelor din frunze B şi C şi folosind aceleaşi sisteme de solvenţi, s-a obţinut în ambele cazuri separarea a patru spoturi alcaloidice, dintre care două în cantitate mare şi două în cantităţi mici. Al patrulea spot alcaloidic de pe cromatogramă prezintă aceeaşi valoare Rf ca şi aconitina folosită ca martor.

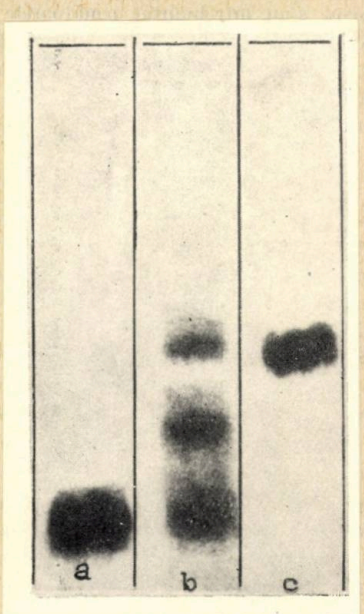


Fig. 1. — Cromatograma alcaloizilor din părţile subterane de *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack/Schinz et Kell): *a*, aconitina; *b*, alcaloizi totali; *c*, berberina.

Examenul cromatografic ne-a indicat că extractele din frunze nu conţin spotul corespunzător berberinei.

Pe baza datelor arătate de examenul cromatografic, s-a trecut la extragerea, izolarea şi identificarea substanţelor (a) şi (b).

Substanţa (a) se prezintă în prisme mici, incolore, inodore, cu p.t. 201—203°. Răspunde la reacţiile generale de precipitare ale alcaloizilor. Este greu solubilă în apă, în eter de petrol, foarte solubilă în cloroform.

Pentru analiza elementară cantitativă, substanţa (a) a fost uscată sub presiune redusă timp de 7 ore la 100°C.

Calculat (%): C, 63,21; H, 7,34; N, 2,17; 0, 27,26.

Găsit (%): a) C, 63,46; H, 7,22; N, 2,29; O, 27,03.

b) C, 63,12; H, 7, 31; N, 2,37; O, 27,12.

Rezultatele obţinute arată că alcaloidul extras de noi corespunde formulei chimice brute $C_{34}H_{47}O_{11}N$, asemănătoare cu formula chimică brută a aconitinei. Produsul răspunde la reacţiile de culoare specifice

aconitinei [12], cu reactivul fosfomolibdic şi cu reactivul fericianura de potasiu şi acid formic. Examenul cromatografic a arătat că acest alcaloid are aceeaşi valoare Rf ca a aconitinei pure, folosită ca martor.

Substanţa (b) se prezintă sub formă de cristale aciculare galbene. Răspunde la reacţiile generale de precipitare ale alcaloizilor. Clorhidratul a fost dizolvat la cald în apă şi trecut sub formă de bază, care a fost cristalizată din cloroform. Baza se prezintă sub formă de cristale aciculare galbene, cu p.t. 145°. Soluţiile sale au fluorescenţă galben-luminoasă, identică cu a berberinei.

Pentru analiza elementară cantitativă substanţa a fost uscată sub presiune redusă timp de 7 ore la 100°C.

Calculat (%): C, 67,98; H, 5,42; N, 3,96; O, 22,64.
Găsit (%): a) C, 67,81; H, 5,31; N, 4,08; 0, 22,80.
b) C, 67,87; H, 5,50; N, 3,76; O, 22,66.

Rezultatele arată că formula chimică brută a acestui alcaloid obţinut de noi din părţile subterane de *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack) Schinz et Kell. este $C_{20}H_{19}O_5N$ şi este asemănătoare cu formula chimică brută a berberinei. De asemenea şi examenul cromatografic a arătat că acest alcaloid are acelaşi Rf şi aceeaşi fluorescenţă ca berberina pură folosită ca martor.

CONCLUZII

Cercetările noastre asupra speciei *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack) Schinz et Kell. ne-au condus la următoarele rezultate:

Am găsit în părţile subterane un conţinut în alcaloizi totali de 0,8320 g%, în părţile aeriene 0,4676 g%, iar în frunze 0,6061 g%.

Examenul cromatografic ne-a indicat prezenţa în părţile subterane a trei spoturi alcaloidice net separate, dintre care două corespund ca valoare Rf cu berberina pură şi aconitina pură folosite ca martor.

În frunze, examenul cromatografic ne-a indicat patru spoturi alcaloidice, dintre care al patrulea are aceeaşi valoare Rf ca aconitina pură şi nici un spot alcaloidic nu a corespuns ca valoare Rf şi fluorescenţă berberinei pure folosite ca martor.

Am extras, izolat şi purificat din părţile subterane doi alcaloizi cristalizaţi, care, după analizele elementare cantitative, au formulele chimice brute $C_{34}H_{47}O_{11}N$ şi $C_{20}H_{19}O_5N$, corespunzătoare aconitinei şi berberinei, precum şi alte proprietăţi fizico-chimice asemănătoare. De asemenea, examenul cromatografic în mai multe sisteme de solvenţi a arătat că aceşti alcaloizi au aceleaşi valori Rf ca aconitina şi berberina pure folosite ca martor.

Facultatea de farmacie,
I.M.F., Bucureşti

Prezentată la redacţie la 8 ianuarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Block R. J., Durrum E. L., Zweig G., *A manual of paper chromatography and paper electroforesis*, ed. II, Acad. Press Inc., New York, 1958, p. 362.
2. Fujita E. Tomimatsu T., *Alkaloids of Thalictrum thunbergii. I. A quaternary base in the root*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **4**, 489 (1956).
3. Fujita E., Tomimatsu T., *Alkaloids of Thalictrum thunbergii D.C. II. A quaternary base in the stem and leaves*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **6**, 107 (1958).
4. Fujita E., Tomimatsu T., *Alkaloids of Thalictrum thunbergii. III. Structure of takatonine, a quaternary base of takato-gura*, J. Pharm. Soc. Japan, **79**, 1 082 (1959).
5. Fujita E., Tomimatsu T., *Studies on the alkaloids of Thalictrum thunbergii D. C.*, J. Pharm. Soc. Japan, **79**, 1 252 (1959).
6. Fujita E., Tomimatsu T., Kano Y., *Structure of Thalicberine and O-Methylthalicberine*, J. Pharm. Soc. Japan, **80**, 1 137 (1960).
7. Fujita E., Tomimatsu T., Kano Y., *Studies on the Alkaloids of Thalictrum thunbergii D.C. IX. Structure of Thalicrine and Homothalicrine, the tertiary bases in the root* J. Pharm. Soc. Japan, **82**, 311 (1962).
8. Hais I. M., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1960, p. 576 şi 748.
9. Ionescu-Stoian P., Fait I., Stanciu N., Savopol E., Cruceanu I., *Die Mechanisierung von Arbeitsverfahren in der Apotheke. 3. Mitteilung : Die Vibroextraktion, Ein Verfahren zur Herstellung wässriger Extraktlösungen*. Die Pharmazie, **16**, 122 (1961).
10. Iunusov S., Progressov N. N., *Ob alkaloidah Thalictrum minus L. Ob alkaloidah Semeistva Ranunculaceae*, J. Obs. Himii, **20**, 1 151 (1950).
11. Lecoyer J. C., *Monograph of the genus Thalictrum*, Bull Soc. roy. bot. Belg., **24**, 78 şi 325 (1885).
12. Lebeau P., Janot M. M., *Traité de pharmacie chimique*, Paris, 1955, t. IV, p. 3 365.
13. Nakajima T., *Chemical studies of Thalictrum minus var. elatum*, J. Pharm. Soc. Japan, **65** B, 422 (1945).
14. Ovsepian A. M., *Raports on the pharmacology of a new preparation for the heart*, Invest. Akad. Nauk. Arm. S.S.R., **9**, 57 (1956).
15. Sekiguchi H. Y., *Flavonoid of the leaves of Thalictrum Thunbergii D.C.*, J. Pharm. Soc. Japan, **80**, 759 (1960).
16. Tomimatsu T., Kano Y., *Studies on the alkaloids of Thalictrum Thunbergii D. C. X. Structure of Thalicrine and Homothalicrine*, J. Pharm. Soc. Japan, **82**, 315 şi 320 (1962).
17. Tomimatsu T., Matsui M., Uji A., Kano Y., *Studies on the alkaloids of Thalictrum Thunbergii D.C. XII. Difference of quaternary Bases by the grown district of plants* J. Pharm. Soc. Japan, **82**, 1 560 (1962).
18. Watt J. M., Breyer-Brandtwijt M. G., *Medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa*, ed. a II-a, Livingstone, Londra, 1962, p. 881.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 199–203 (1965)

ACȚIUNEA PROTECTOARE A UNOR GLUCIDE ASUPRA DENATURĂRII PRIN CĂLDURĂ A TRIPSINEI *

MEDARD KEREKES și POMPILIA FURDA

577.15.036

Rezumat. — S-a determinat acțiunea protectoare a unor mono- și dizaharide asupra denaturării prin căldură a tripsinei, măsurîndu-se activitatea acesteia înainte și după denaturarea în prezența și absența glucidelor, întrebuințîndu-se ca substrat azocazeina.

S-a constatat că efectul protector este în funcție de dimensiunile moleculelor glucidice, fiind influențat însă și de configurația acestora. Dintre hexoze efectul cel mai pronunțat îl prezintă glucoza și galactoza.

Fenomenul are la bază, probabil, izolarea moleculelor proteice.

Cercetările referitoare la protejarea proteinelor față de denaturarea prin căldură prezintă un interes nu numai teoretic, ci și practic, fiind cunoscut efectul stabilizator al glucozei asupra sîngelui conservat, asupra unor suspensii ale subfracțiunilor celulare sau asupra extractelor de plante [1], fără ca mecanismul acestui efect să fie explicat în mod satisfăcător.

Pentru studierea fenomenului de protecție împotriva denaturării prin căldură s-au efectuat cu mai multe decenii în urmă numeroase cercetări. H. Lüers și P. Lorinsen [2] au fost primii care au studiat această problemă, găsind că maltoza inhibă inactivarea prin căldură a amilazeii L. A. Zilber [3] descrie acțiunea protectoare a glicerolului, glucozei și zaharozei față de inactivarea prin căldură a unor toxine bacteriene. Zaharoza poate să prevină coagularea prin căldură a ovalbuminei și serum-albuminei [4]. Monozaharidele, în concentrația moderată (0,25 M), pot să suprime eliberarea grupărilor -SH reactive ale ovalbuminei în cursul încălzirii [5]. Majoritatea acestor studii nu au permis decît concluzi. calitative sau semicantitative.

În lucrarea de față ne-am propus un studiu mai exact al fenomenului, pentru a putea determina și exprima acțiunea protectoare a unor glucide și pentru a elucida unele aspecte ale mecanismului de protecție. Proteina supusă denaturării a fost tripsina, activitatea ei putînd fi ușor determinată.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 3 (1965), în limba germană.

MATERIALE ŞI METODE

a. *Tripsina.* Am preparat din tripsină Merck o soluţie de 0,2% în tampon fosfatic M/15 cu pH 7,5.

b. *Substrat.* Am întrebuinţat ca substrat azocazeină în soluţie de 2,5%, în fosfat disodic M/15, cu pH-ul final de 7,5. Azocazeina a fost preparată din cazeină Hammarsten (Merck), după [6], cu unele modificări. Astfel, am înlocuit dializa prin precipitarea azocazeinei cu cîteva picături de acid acetic, urmată de centrifugare la turaţie mică şi de spălarea precipitatului de două ori cu acid acetic 1% şi o dată cu apă distilată. Precipitatul se usucă în etuvă la 60°C.

c. *Glucide.* Soluţiile glucidelor conţinînd şi tripsină au fost preparate în felul următor: am dizolvat 0,02 M glucidă în 5 ml tampon; am adăugat 2 ml din soluţia de tripsină 0,2%, ţinînd apoi eprubetele în baie de apă la 38°C şi agitînd din timp în timp, pînă la dizolvare. După dizolvare s-a completat cu tampon la 10 ml.

d. *Determinarea activităţii tripsinei native.* Soluţiile de azocazeină şi tripsină, respectiv de tripsină + glucide, au fost ţinute timp de 5 min la 40°C. Apoi, la 1 ml de azocazeină s-a adăugat 1 ml de tripsină, respectiv tripsină + glucide, după care s-a incubat timp de 10 min la 40°C. Imediat după incubaţie s-au adăugat 2 ml de acid tricloracetic 6%, filtrînd după 10 min. La 2 ml din filtrat s-au adăugat 2 ml NaOH N şi s-a citit extincţia la fotometrul Pulfrich, cu filtrul S 42, în cuva de 1 cm. Martorii s-au lucrat în mod identic, fără incubaţie. Scăzînd din valorile extincţiilor valorile martorilor, am exprimat activitatea enzimatică în micrograme de azocazeină hidrolizată în condiţiile descrise.

e. *Denaturarea tripsinei şi determinarea activităţii tripsinei denaturate.* Denaturarea s-a efectuat ţinînd soluţiile de tripsină (cu sau fără glucide) timp de 10 min în ultratermostatul Hoeppler, la temperaturile indicate mai jos. Imediat după aceasta s-a adăugat 1 ml de azocazeină, încălzită în prealabil la aceleaşi temperaturi, iar amestecul s-a menţinut în continuare la temperatura denaturării, timp de 10 min. Activitatea enzimei denaturate a fost determinată la aceste temperaturi neobişnuit de înalte şi nu la temperatura optimă a enzimei pentru motivul că, în cazul incubaţiei la 40°C, poate avea loc o renaturare destul de însemnată a tripsinei, chiar în cursul incubaţiei [7].

Activitatea enzimatică s-a măsurat ca la punctul d., raportîndu-se activitatea tripsinei denaturate în prezenţa glucidelor la activitatea celei denaturate în absenţa acestora, respectiv la activitatea tripsinei native, considerată ca 100%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Am determinat la început acţiunea D-glucozei asupra tripsinei, întrebuinţînd glucoza în diferite concentraţii şi efectuînd denaturarea, respectiv incubaţia, la diferite temperaturi (fig. 1).

Activităţile au fost raportate la cele ale tripsinei denaturate în absenţa glucozei, la aceleaşi temperaturi, eliminîndu-se astfel efectul temperaturii asupra vitezei de reacţie.

Se observă că glucoza inhibă activitatea tripsinei (fig. 1, curba *a*), fenomen de altfel cunoscut [8]. La temperaturi mai înalte apare însă clară acţiunea protectoare a glucozei faţă de inactivarea tripsinei, după cum reiese din curbele *b* şi *c* din figura 1. Această acţiune este cea mai pronunţată la concentraţia de 1 M. La concentraţii mai mari, se pune în evidenţă

însă din ce în ce mai mult acțiunea inhibitoare față de activitatea enzimatică. În ceea ce privește temperaturile, acțiunea protectoare cea mai pronunțată se observă în cazul denaturării la 60°C. La 50°C denaturarea este neînsemnată; astfel efectul protector al glucozei nu se manifestă în mod suficient, acesta fiind acoperit de efectul inhibitor. La 70°C puterea protectoare este considerabil redusă (tabela nr. 1).

Tabela nr. 1

Efectul protector al glucozei de 1 M față de denaturarea prin căldură a tripsinei. Denaturare la 70° timp de 10 min. Activitatea tripsinei denaturate este exprimată în procente, raportată la activitatea tripsinei nedenaturate

Denaturare	Activitatea tripsinei denaturate (%)
În absența glucozei	17,8
În prezența glucozei	46,6

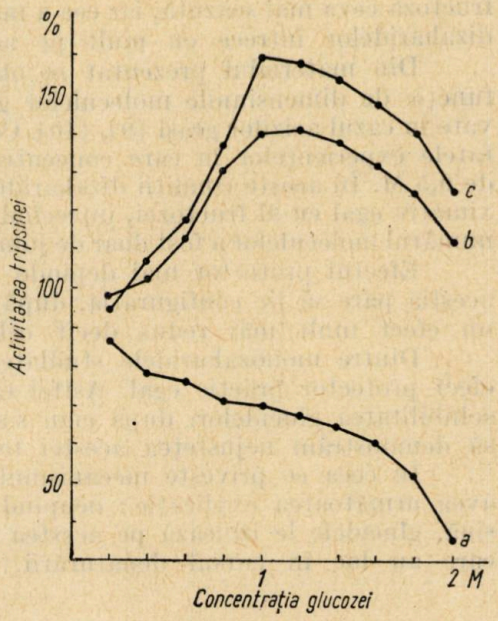


Fig. 1. — Efectul protector față de denaturarea prin căldură a tripsinei, exercitat de glucoză în diferite concentrații și la diferite temperaturi. Activitatea tripsinei denaturate în prezența glucozei s-a raportat la activitatea tripsinei tratate în mod asemănător în absența glucozei, considerată ca 100%.

a — activitatea tripsinei native;
b — denaturare și incubație la 50°C;
c — denaturare și incubație la 60°C.

Pe baza acestor experiențe, am întrebuințat în continuare glucidele în concentrația de 1 M, raportînd valorile hidrolizei măsurate în prezența lor la cea a tripsinei native pentru a elimina efectul de inhibiție asupra activității enzimatice. Am studiat efectul următoarelor glucide: D-arabinoza, D-glucoza, D-galactoza, D-manoza, D-fructoza, maltoza și zaharoza. Acțiunea dizaharidelor a fost examinată și în concentrația de 0,5 M. Rezultatele obținute sînt redate în tabela nr. 2.

Acțiunea protectoare cea mai slabă o prezintă arabinoza. Dintre hexozele cercetate, glucoza și galactoza au o acțiune aproximativ egală,

Tabela nr. 2

Efectul protector al unor glucide față de denaturarea prin căldură a tripsinei. Denaturarea s-a efectuat la 60°C timp de 10 min. Activitatea tripsinei denaturate în prezența, respectiv absența glucidelor este exprimată în procente, raportată la activitatea tripsinei nedenaturate

Glucidă	Concentrația glucidei (M)	Activitatea tripsinei denaturate (%)
—	—	50,0
D-arabinoză	1	66,3
D-glucoză	1	115,0
D-galactoză	1	114,5
D-manoză	1	91,5
D-fructoză	1	107,9
zaharoză	1	137,5
zaharoză	0,5	99,0
maltoză	1	146,8
maltoză	0,5	105,6

fructoza ceva mai scăzută, iar cea a manozei este mult mai redusă. Efectul dizaharidelor întrece cu mult pe acela al monozaharidelor.

Din materialul prezentat se observă că efectul protector este în funcţie de dimensiunile moleculelor glucidice, asemănător relaţiei observate în cazul acizilor graşi [9], [10]. Constatarea este sprijinită şi de rezultatele experienţelor în care concentraţia maltozei şi a zaharozei a fost de 0,5 M. În aceste condiţii dizaharidele prezintă un efect protector aproximativ egal cu al fructozei, întrecînd pe cel al manozei. Or, în acest caz, numărul moleculelor a fost doar de jumătate faţă de cel al monozaharidelor.

Efectul protector mai depinde însă şi de alţi factori. Unul dintre aceştia pare să fie configuraţia, după cum arată cazul manozei, care are un efect mult mai redus decît celelalte hexoze.

Dintre monozaharidele studiate, glucoza şi galactoza prezintă un efect protector practic egal. Astfel efectul protector nu este paralel cu solubilitatea glucidelor, după cum s-a afirmat [11]. Am reuşit de altfel să demonstrăm nejusteţea acestei teorii şi prin alte metode [12].

În ceea ce priveşte mecanismul efectului protector, acesta poate avea următoarea explicaţie : ocupînd spaţiile dintre moleculele de tripsină, glucidele le izolează pe acestea unele de altele, încetinind reacţiile care au loc în cursul denaturării.

CONCLUZII

1. S-a determinat concentraţia glucozei, pentru care efectul termoprotector este maxim şi peste care efectul ei inhibitor creşte mai repede decît acţiunea sa protectoare.

2. Efectul protector al glucidelor faţă de denaturarea prin căldură a tripsinei este în funcţie de dimensiunile moleculelor glucidice.

3. Efectul protector este influenţat şi de configuraţia spaţială a moleculelor glucidice.

4. Fenomenul de protecţie are, probabil, la bază izolarea moleculelor proteice, îngreuind astfel reacţiile care au loc în cursul denaturării.

Laboratorul de biochimie,
Baza de cercetări ştiinţifice Tîrgu-Mureş
a Academiei R.P.R. şi
Catedra de biochimie, I.M.F., Tîrgu-Mureş

Prezentată la redacţie la 14 ianuarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. R. Heitefuss, J. Buchanan-Davidson, M. A. Stahmann, *The stabilization of extract of cabbage leaf proteins by polyhydroxy compounds for electrophoretic and immunological studies*, Arch. Biochem. Biophys., **85**, 200 (1959).
2. H. Lüers, P. Lorinsen, *Über die Hitze- und Strahlungsinaktivierung der Malzamylase*, Biochem. Z., **144**, 212 (1924).
3. L. A. Zilber, *Bazele imunologiei*, Ed. medicală, Bucureşti, 1959, p. 257.

4. A. Beilinson, *Thermostabilisation der Eiweisslösungen mit Rohrzucker und Glycerin*, Biochem. Z., **213**, 399 (1929).
5. C. D. Ball, C. R. Hardt, W. J. Duddles, *The influence of sugars on the formation of sulfhydryl groups in heat denaturation and heat coagulation of egg albumin*, J. Biol. Chem., **151**, 163 (1943).
6. J. Charney, R. M. Tomarelli, *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*, J. Biol. Chem., **171**, 501 (1947).
7. M. L. Anson, A. F. Mirsky, *The equilibrium between active native and inactive denatured trypsin*, J. Gen. Physiol., **17**, 393 (1934).
8. L. Farber, A. M. Wynne, *Pancreatic proteinase. II. The effects of various compounds on the activity of the enzyme*, Biochem. J., **29**, 2323 (1935).
9. P. D. Boyer, F. G. Lum, G. A. Ballou, J. M. Luck, R. G. Rice, *The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin. I. Stabilization against denaturation*, J. Biol. Chem., **162**, 181 (1946).
10. P. D. Boyer, G. A. Ballou, J. M. Luck, *The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin. II. The nature and extent of the combination*, J. Biol. Chem., **167**, 407 (1947).
11. F. W. Putnam, *Protein denaturation*, în *The proteins*, ed. by H. Neurath and K. Bailey, Acad. Press New York, 1953. Vol. I, B, p. 828.
12. M. Kerekes, *Studiul acțiunii protectoare a unor glucide asupra denaturării prin căldură a proteinelor serice*, St. cerc. biochim., **6**, 245 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 205–209 (1965)

ACȚIUNEA HISTAMINEI ȘI TIAMINPIROFOSFATULUI ASUPRA NIVELULUI MUCOPROTEINELOR SERICE, LA ȘOBOLANII CANCEROȘI

IRINA KIȚULESCU, D. PASCU și AMALIA CURIGUȚ

616–006–092.9 : 616.153.1

Rezumat. — Se constată că histamina (H) și tiaminpirofosfatul (TPP), injectate intraperitoneal la șobolani exercită o puternică influență asupra mucoproteinelor din serul șobolanilor purtători și nepurtători de tumoare, marcînd prin această acțiune diferențe semnificative între șobolanii purtători de tumoare și cei necanceroși.

Efectul H și TPP studiat pe o perioadă de 4 zile după injectare se manifestă la șobolanii necanceroși prin creșteri mari ale cantității mucoproteinelor serice. Acestea ating valori maxime la 48 și la 96 de ore după injectarea TPP, cînd creșterile lor sînt în medie de 130 și 146%, și de asemenea după 48 și 96 de ore de la injecția de TPP asociat cu H, cînd se obțin creșterile medii ale mucoproteinelor serice de 169 și 175% la șobolanii necanceroși.

Șobolanii purtători de tumoare au nivelul mucoproteinelor serice crescut față de șobolanii necanceroși. Injectarea H și TPP singure sau asociate provoacă variații cantitative mici ale mucoproteinelor serice, reprezentate de creșteri pînă la + 20 și de scăderi pînă la −40%. Histamina provoacă numai scăderi ale mucoproteinelor serice la șobolanii purtători de tumoare, iar asocierea TPP + H nu modifică nivelul acestora.

TPP și H determină atît la șobolanii purtători de tumoare cît și la cei necanceroși variații mari în constituția mucoproteinelor serice, exprimate prin raportul dintre zahărul și proteina mucoproteinelor (Z/P). Valorile cele mai mari ale acestor rapoarte se constată la animalele purtătoare de tumori. Diferențele cele mai nete obținute prin aceste rapoarte între șobolanii purtători de tumoare și cei necanceroși sînt produse de injectarea de histamină. În cursul celor 4 zile după injectarea histaminei valorile limită ale raportului Z/P la animalele purtătoare de tumoare sînt 0,50–0,80, iar la animalele necanceroase sînt 0,23–0,34. Valoarea medie a raportului Z/P după injectarea histaminei este de 0,30 la animalele necanceroase și de 0,64 la animalele purtătoare de tumoare.

Numeroși autori au constatat existența unei relații directe între histamină și mucoproteine. Astfel, C. Velican și colab. [1] au obținut o intensificare a sintezei mucopolizaharidelor acide în microfagele alveolare,

determinînd prin diverse mijloace o creștere a cantității de histamină. Într-o lucrare recentă [2], noi am folosit creșterea cantității mucoproteinelor serice la șobolan pe o perioadă de patru zile, determinată de injecția de histamină, pentru a o compara cu efectul radiobiologic.

Apariția unei cantități crescute de histamină este considerată drept una dintre primele verigi ale lanțului de procese care ilustrează formarea unei leziuni tisulare [3]. Este logic să se sugereze ipoteza că nivelul crescut al mucoproteinelor serice s-ar datora unor procese catabolice specifice anumitor distrugeri celulare. Această presupunere găsește suport în experiențele făcute de Lack și colab. [4] cu papaină, prin care autorii au demonstrat proprietatea papainei injectate intravenos de a elibera din cartilaje mucoproteine, producînd căderea urechilor la iepurii astfel tratați.

Cercetări recente au demonstrat însă că nivelul crescut al mucoproteinelor serice, apărut temporar în urma diverselor leziuni experimentale, se datorește în cea mai mare parte activităților de sinteză proteică crescute în ficat [5].

Atît în cazul preponderenței sintezelor proteice cît și în cazul preponderenței lizelor proteice sînt interesate creșterile diverselor activități protеazice, în funcție de specificitatea activității lor.

Relația dintre unele activități proteazice și mediatorii activității nervoase histamina (H) și tiaminpirofosfatul (TPP) am constatat-o în altă lucrare [6], în care a fost pusă în evidență o oarecare specificitate în privința acțiunii acestor mediatori asupra activității proteazelor. Tiaminpirofosfatul a acționat ca inhibitor al papainei, iar histamina a influențat activitatea tripsinei.

Am considerat că răspunsul organismului la stimularea proceselor de liză sau a celor de sinteză proteică, exprimate prin creșterea cantității mucoproteinelor serice, poate fi diferit la organismul canceros și, de aceea, în lucrarea de față am folosit acțiunea celor doi mediatori ai activității nervoase, tiaminpirofosfatul și histamina, care acționează atît de diferit asupra proteazelor, pentru a scoate în evidență relații metabolice care să diferențieze organismul canceros de cel necanceros.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-au utilizat în experiențe 7 loturi de șobolani albi, rasa Wistar, de 100 g aproximativ. Dintre acestea, 4 loturi erau constituite din șobolani purtători de tumoare Jensen, în momentul experimentării tumoarea avînd 14 zile de la grefare.

Lotul I era constituit din 25 de șobolani injectați cu 1 ml de soluție care conținea 1 mg de histamină injectată la 100 g animal.

Lotul II era constituit din 25 de șobolani purtători de tumoare care au fost injectați la fel ca cei din lotul I.

Lotul III era constituit din 25 de șobolani injectați fiecare cu cîte 1 ml de soluție care conținea 2 mg de tiaminpirofosfat și 20 mg de piruvat de sodiu.

Lotul IV era constituit din 25 de șobolani purtători de tumoare care au fost injectați ca cei din lotul III.

Lotul V era constituit din 25 de şobolani injectaţi fiecare cu amestecul tiaminpirofosfat şi piruvat plus histamină, în aceleaşi concentraţii ca cele utilizate la loturile I—IV.

Lotul VI era constituit din 25 de şobolani purtători de tumoare injectaţi similar celor din lotul V.

Lotul VII a conţinut 25 de şobolani martori (neinjectaţi).

S-au dozat mucoproteinele serice în serul fiecărui şobolan, utilizîndu-se metoda de dozare a mucoproteinelor serice dată de Winzler [7]. Proteina s-a dozat prin tehnica Lowry [8].

Concentraţia mucoproteinelor serice obţinută în dozările făcute pe serul fiecărui şobolan s-a exprimat în mg de proteină din mucoproteinele conţinute în 100 ml de ser. Galactozamanoza mucoproteinelor, dozată prin reacţia de orcină [7], a fost folosită pentru stabilirea raportului dintre ea şi proteina mucoproteinelor.

REZULTATE

Rezultatele sînt consemnate în figura 1. Ele demonstrează acţiunea puternică pe care mediatorii activităţii nervoase, histamina şi tiaminpirofosfatul, o exercită asupra cantităţii de mucoproteine din ser, aceasta putînd atinge creşteri de 170% sau scăderi de 40%. În ceea ce priveşte

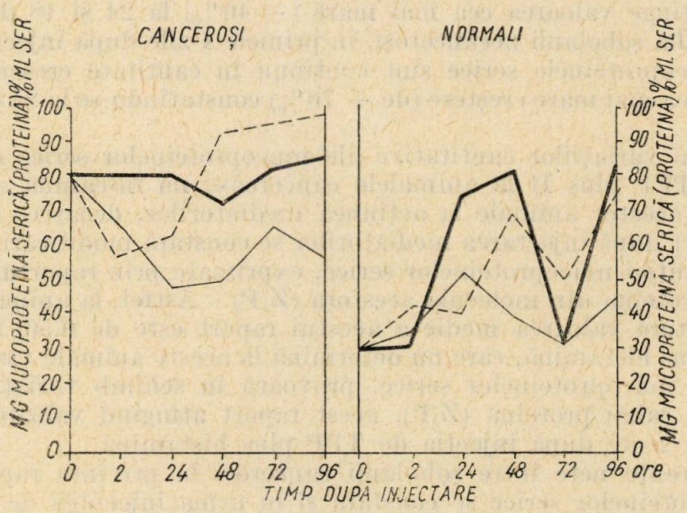


Fig. 1. — Acţiunea histaminei (H) şi a tiaminpirofosfatului (TPP) asupra nivelului mucoproteinelor serice la şobolani.

——— Acţiunea TPP. ——— Acţiunea H. – – – – Acţiunea TPP + H.

creşterile şi scăderile cantităţii mucoproteinelor serice la şobolanii canceroşi şi necanceroşi faţă de martori, acestea sînt semnificative statistic.

Rezultatele marchează, totodată, anumite particularităţi ale metabolismului canceros. La şobolanii canceroşi, histamina şi tiaminpirofosfatul determină variaţii ale mucoproteinelor serice care diferă nu numai prin mărime, dar şi prin sens de variaţiile mucoproteinelor serice produse în mod similar la şobolanii necancerizaţi.

În general, variațiile cantitative ale mucoproteinelor serice sînt mai mari la animalele necanceroase decît la cele canceroase. De exemplu, creșterile mucoproteinelor serice produse de tiaminpirofosfat la șobolanii necanceroși sînt de 130% la 48 de ore după injectarea tiaminpirofosfatului și de 145% după 96 de ore de la injectare, pe cînd creșterile determinate de tiaminpirofosfat la șobolanii canceroși se situează între 15% (la 48 de ore după injectare) și 20% (la 96 de ore după injectare).

Creșterea mică a cantității de mucoproteine din serul animalelor cancerizate este, probabil, în legătură cu nivelul ridicat permanent al cantității de mucoproteine din serul animalelor canceroase, constatat pe loturile de animale martore.

În general, animalele canceroase, sau nu răspund la injecția mediatorilor prin variații cantitative ale mucoproteinelor serice — ca, de exemplu, loturile de animale canceroase injectate cu tiaminpirofosfat plus histamină (pe cînd loturile de animale necanceroase injectate similar prezintă creșteri de 145% și 170% ale mucoproteinelor serice —, sau răspund la injectarea mediatorilor printr-o scădere a cantității mucoproteinelor serice — de exemplu injectarea de histamină la animalele canceroase provoacă o scădere a mucoproteinelor serice care în perioada de 4 zile după injecție atinge valoarea cea mai mare (— 40%) la 24 și 48 de ore după injecție. La șobolanii necanceroși, în primele 4 zile după injectarea histaminei mucoproteinele serice sînt continuu în cantitate crescută față de martori, cea mai mare creștere (de + 70%) constatîndu-se la 24 de ore după injecție.

Lipsa variațiilor cantitative ale mucoproteinelor serice după injectarea de TPP plus H la animalele canceroase nu înseamnă sensibilitate scăzută a acestor animale la acțiunea mediatorilor, deoarece la un timp foarte scurt după injectarea mediatorilor se constată modificări accentuate ale constituției mucoproteinelor serice, exprimate prin raportul dintre zahărul și proteina din molecula acestora (Z/P). Astfel, la animalele canceroase martore valoarea medie a acestui raport este de 0,50, iar injecția de TPP plus histamină, care nu determină la aceste animale variații cantitative ale mucoproteinelor serice, provoacă în schimb variații mari ale raportului zahăr/proteină (Z/P), acest raport atingînd valoarea maximă de 0,98 la 2 ore după injecția de TPP plus histamină.

Diferențe nete între șobolanii canceroși în privința raportului Z/P al mucoproteinelor serice se constată și în urma injectării de histamină. După injectarea histaminei, valoarea medie a raportului Z/P la animalele necanceroase este de 0,30, obținută la un număr de 30 de animale care în perioada de 4 zile după injecție au prezentat variații cuprinse între valorile limită 0,23—0,34. Valoarea medie a raportului Z/P la animalele purtătoare de tumoare, după injectarea histaminei, este de 0,64, obținută de asemenea la un număr de 30 de animale, care au prezentat însă variații cuprinse între valorile limită 0,50—0,80.

Laboratorul de enzimologie
al Institutului oncologic București

Prezentată la redacție la 12 ianuarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Velican C., Velican Doina, Carp N., *Histochimia și fiziopatologia mucopolizaharidelor*, Edit. Acad. R.P.R., 1963, p. 47.
2. Costăchel O., Kițulescu I., Pascu D., Vol. rezumate al Conf. de radiobiol. din București, 11—13 iunie 1964, Edit. Acad. R.P.R., p. 34.
3. Cameron R., Spector W. G., *The chemistry of the injured cell*, Ch. C. Thomas Springfield, Illinois, U.S.A., 1961, p. 118.
4. Lack C. H., Anderson A. J., Ali S. Y., *Action of plasmin on cartilage matrix in vivo*, Nature, **191**, 1 402 (1961).
5. Chandler A. M., Neuhaus O. W., *Synthesis of serum glicoproteins in response to injury*, Amer. J. Physiol., **206**, 169 (1964).
6. Kițulescu I., Băluță V., *Date experimentale privind reglarea activității protezelor prin factorii fiziologici*, St. cerc. biochim., **6**, 523 (1963).
7. Winzler R. J., în *Methods of biochemical analysis*, D. Glick, Intersci. Publish. New York—Londra, 1955, vol. II, p. 279.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. I., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 211–220 (1965)

REACTIVITATEA BIOCHIMICĂ ŞI IMUNOLOGICĂ A MACROFAGULUI HISTIOID
III. ACTIVITATEA FOSFOESTERAZICĂ

EUGENIU PĂUNESCU şi ECATERINA HADÎRCĂ-ILICA

576.8.098

Rezumat. — Celulele mononucleate, de origine histiocitară, cu capacităţi fagocitare („macrofage histioide"), prezente în exsudatele peritoneale ale cobailor vaccinaţi B.C.G., manifestă — comparativ cu celulele similare recoltate de la cobai normali — o intensificare a activităţilor fosfoesterazice (lecitinaza C şi tuberculofosfatidaza). O intensificare similară a activităţii fosfoesterazice se constată şi în ţesuturile limfoid-histiocitare provenite de la cobai şi iepuri vaccinaţi B.C.G., cea mai importantă activitate fosfoesterazică fiind decelabilă la nivelul ganglionilor limfatici. Organe similare, prelevate de la iepuri imunizaţi antistafilococic (imunitate umorală), nu manifestă o intensificare a activităţii fosfoesterazice comparabilă cu aceea a animalelor vaccinate B.C.G. (imunitate celulară).

Starea de imunitate antituberculoasă este însoţită de o serie de modificări metabolice la nivelul ţesuturilor limfoid-histiocitare, care asigură o mai mare eficienţă antibacilară a celulelor respective; printre aceste modificări metabolice se constată şi creşterea capacităţii de a dezagrega fosfolipidele uzuale (lecitine) şi fosfatidul prezent în celula de micobacterii.

Procesele imunitare ce se desfăşoară în cursul interacţiunii gazdă-parazit în tuberculoză cuprind atît aspecte caracteristice imunităţii de tip umoral (anticorpi serici) cît şi aspecte ale imunităţii de tip celular (rezistenţă şi hipersensibilitate întîrziată celulară). Însă în timp ce rezistenţa celulară este eficientă antibacilar, cea umorală este lipsită de eficienţă directă [1], [2].

Rezistenţa celulară în tuberculoză are ca rezultat final localizarea procesului tuberculos şi reducerea pînă la suprimare a gradului de necroză la nivelul leziunii. Imunitatea umorală — prin anticorpii antituberculoproteici, antipolizaharidici şi antifosfatidici — este consecinţa distrucţiei la nivel celular a corpilor bacilari, urmată de eliberarea componentelor bacilare antigenice; imunitatea umorală în tuberculoză apare deci ca o reflectare a rezistenţei celulare, a capacităţii anumitor celule de a inhiba dezvoltarea şi de a distruge corpii bacilari[1].

[1] Trebuie însă amintit că anticorpii serici antituberculoproteici sînt capabili să neutralizeze efectul declanşator al hipersensibilităţii celulare de tip întîrziat pe care îl deţin proteinele de origine bacilară [3].

Pentru aceste motive, studiul mecanismelor imunitare în tuberculoză se adresează în primul rînd componentei celulare și, în mod special, acelor celule care au un potențial reactiv corespunzător : capacitatea de mobilizare și mobilitatea necesară sosirii la locul de invazie, chimiotactism electiv pentru celula și componentele bacilare, potențialul de a înghiți și a digera bacilii, rezistența față de toxicitatea unor componente bacilare etc.

Celule dotate cu asemenea caractere sînt cele de origine reticulohistiocitară și — conform datelor acumulate în prezent [4—6] — corespund mononuclearelor diferențiate din histiocite. Asemenea celule—atît *in vivo* cît și *in vitro*—sînt gazdele obișnuite ale bacililor, care se dezvoltă intracelular. Cînd provin de la animalul imunizat contra tuberculozei, aceste celule sînt capabile să inhibe dezvoltarea bacilului tuberculozei [7] și, dacă sînt transferate la un animal nou (normal), ele pot asigura o creștere a rezistenței acestuia față de infecția tuberculoasă [8].

Pentru aceste celule—mononucleate, de origine histiocitară, capabile să fagociteze și să găzduiască bacilul tuberculozei — am preferat denumirea de „macrofag histioid" (MH).

Alături de macrofagul histioid, limfocitul este o altă celulă care participă în mod constant la procesele celulare ce reflectă interacțiunea organismului cu bacilul. Limfocitul este prezent la locul de invazie și oriunde au loc diseminări bacilare. Această celulă este capabilă să transfere în mod pasiv starea de hipersensibilitate tuberculinică [1], [9] și posedă structuri celulare de tip anticorp, care pot să fixeze tuberculoproteina [10], [11], [12].

Actualmente există deci suficiente premise pentru a conchide că, în tuberculoză, reactivitatea celulară este de tip limfoid histiocitar [4], [1], [6], fiind bine evidențiată participarea activă a limfocitelor în procesele de hipersensibilitate de tip întîrziat și aceea a macrofagelor histioide (MH) în procesele de rezistență antibacilară.

Activitatea antibacilară a MH „imune" este complexă : aceste celule pot transfera pasiv, în serie, rezistența specifică față de infecția cu micobacterii [8], iar lizatele lor — în prezență de Tween 80, care mărește permeabilitatea peretelui celular bacilar [13]—au acțiune bactericidă specifică pentru tulpinile de *Mycobacterium tuberculosis* [14]. Eficiența fagocitară crescută a MH „imune" coincide cu o activitate intensificată a proceselor enzimatice energetice ale acestor celule [15], care de altfel prezintă unele diferențe semnificative de compoziție chimică față de macrofagele provenite de la animalul neimunizat [16].

De asemenea fagocitele de la animalul imunizat prezintă o activitate hidrolitică intensă față de o serie de lipide, printre care unele de origine bacilară [17], [18], [19], ceea ce contribuie la creșterea eficienței antibacilare a acestor celule, dacă se ține seama de structura deosebit de bogată în lipide a peretelui celular al micobacteriilor [20].

În ceea ce privește activitatea lipazică a mononuclearelor „imune", Colwell și colab. [21] la cobai vaccinați B.C.G., ca și Dannenberg și Bennett [22] la iepuri infectați cu bacilul tuberculozei, nu au constatat intensificări semnificative ale acestei funcții enzimatice.

Lucrări mai vechi, publicate de Gerstl şi Tennant [23], [24], au semnalat—la animalele imunizate cu o tulpină umană atenuată de *Mycobacterium* (P15-B)—intensificarea capacităţii triturateIor de ficat de a hidroliza fosfolipidele şi, în special fosfatidul extras din bacilul tuberculozei. Aceste studii sugerează că, prin imunizare contra tuberculozei, macroorganismul dobîndeşte calităţi speciale, care îi permit să catabolizeze cu mai mare eficienţă atît fosfolipidele rezultate din distrucţia tisulară ce însoţeşte procesele de autoapărare contra infecţiei [25], cît şi fosfolipidele de origine bacilară, rezultate din dezintegrarea prin fagocitare a micobacteriei invadante.

Pentru a verifica această ipoteză, am întreprins o serie de cercetări asupra activităţilor esterazice şi fosfoesterazice ale exsudatelor peritoneale cu monocite şi ale unor ţesuturi limfoid-histiocitare (ganglioni limfatici, ficat şi plămîni). Cercetările au fost întreprinse comparativ, la animale normale şi vaccinate B.C.G. De asemenea, ţinînd seama de caracteristicile diferenţiale ale imunităţii în tuberculoză (rezistenţă celulară), am efectuat, în paralel, determinarea activităţii fosfoesterazice şi cu organe provenite de la iepuri imunizaţi antistafilococic (rezistenţă umorală), cu scopul de a putea preciza dacă asemenea modificări ale activităţii enzimatice sînt specifice imunităţii de tip celular.

MATERIAL ŞI METODE

Animalele de laborator folosite au fost cobai (450—550 g) şi iepuri (2 350—3 400 g) de crescătorie. Vaccinarea B.C.G. s-a practicat pe cale intraperitoneală, cu 6—10 săptămîni înainte de experiment, folosind doze mari de vaccin; 10 mg microb semiumed pentru un cobai şi 40 mg pentru un iepure. Imunizarea antistafilococică s-a făcut la 5 iepuri pe cale intravenoasă, în decurs de 6 săptămîni: în primele 3 săptămîni cîte 2 inoculări de suspensie de stafilococ auriu (tulpina Oxford), inactivat 30 de minute la 58°C; în următoarele 3 săptămîni cîte o inoculare de suspensie de cultură de 24 de ore, neinactivată, din aceeaşi tulpină de stafilococ. În momentul experimentării, la 12 zile de la ultima inoculare, titrul aglutinant al serului animalelor imunizate era 1/4 000—1/8 000.

Macrofagele histioide au fost obţinute din exsudatele peritoneale de 4 zile, provocate cu ajutorul extractului bacilar acetonosolubil, după tehnica descrisă anterior [15].

Preparatele enzimatice au fost obţinute prin trturarea organelor (ficat, plămîni şi ganglioni limfatici mezenterici) recoltate imediat după omorîrea animalelor (fracturarea coloanei vertebrale) şi spălate cu soluţie salină fiziologică. Trituratele au fost apoi deshidratate cu acetonă şi, după spălare cu eter, au fost uscate în vid. Pulberea obţinută a constituit preparatul enzimatic.

Pentru a evita variaţiile individuale, la obţinerea fiecărui preparat enzimatic am folosit organele provenite de la 4—6 cobai sau 3—4 iepuri.

Activitatea fosfoesterazică a fost determinată în paralel, folosind ca substrat atît lecitina (L-α-fosfatidil-colină)[2] cît şi tuberculofosfatidul (L-α-fosfatidil-

[2] Preparat Merck.

inozitol)[3], substanţe cu structură similară (fig. 1). Estimarea activităţii fosfoesterazice a fost făcută indirect, prin dozarea P anorganic (metoda Briggs) liberat de fosfomonoesteraza tisulară după prealabila acţiune a *fosfoesterazei*[4], care scindează fosfatul organic[5] esterificat la C-3 al moleculei de glicerol (fig. 1).

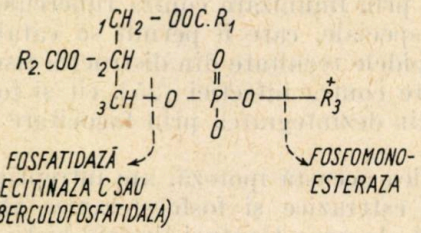


Fig.1. — Locul de acţiune al fosfatidazei şi fosfomonoesterazei în cazul moleculelor de lecitină şi tuberculofosfatid.
R_1 şi R_2 = acizii oleic şi stearic în molecula de lecitină; acizii metil-*10*-stearic şi ftienoici (micolipenic-I) în molecula de tuberculofosfatid.
R_3 = colină în molecula de lecitină; mioinozitol-pentamanozid în molecula de tuberculofosfatid.

Fiecare sistem de reacţie conţinea:

20 mg preparat enzimatic (pulbere de organe) sau 1 ml suspensie de MH;

12 ml tampon veronal (0,02 M, cu pH 7,6);

2 ml soluţie salină fiziologică cu adaos de ioni metalici bivalenţi (Mg^{2+}, Mn^{2+} şi Ca^{2+}, în concentraţie de 10^{-3} M) şi de antibiotice (penicilină 10 000 u.Oxf./ml şi streptomicină 20 000 μg/ml);

2 ml substrat (lecitină sau tuberculofosfatid 0,5 %) sau — în cazul martorului — apă distilată.

Flacoanele cu sistemele enzimatice au fost incubate la 37°C şi s-au luat probe duble — din martori, sistemele lecitinazice şi fosfatidazice — la o oră, 24 de ore şi 48 de ore, determinîndu-se P anorganic liberat în supernatant, după precipitarea P organic cu acid tricloracetic [15]. Pentru redarea rezultatelor, după scăderea valorii martorului din valoarea fiecărei probe (media a două determinări), activitatea celor două tipuri de fosfoesteraze a fost exprimată în μg P liberat de echivalentul a un milion de celule de MH sau a 100 mg de pulbere de triturat de organe.

REZULTATE

În tabelul nr. 1 şi în figurile 2—5 sînt redate rezultatele determinărilor activităţii fosfoesterazice a suspensiilor de MH şi a trituratelor de ficat, plămîn şi ganglioni limfatici provenite de la cobai normali şi vacci-

[3] Obţinut din *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, tulpina $H_{37}Rv$, după tehnica descrisă anterior [26].

[4] *Lecitinaza C* sau, în cazul fosfatidului, *tuberculofosfatidaza*.

[5] Fosfat de colină în cazul lecitinei; fosfat de mioinozitol-pentamanozid [27], în cazul tuberculofosfatidului.

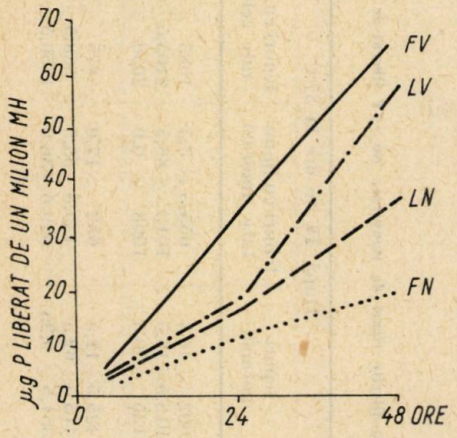


Fig. 2. — Activitatea fosfoesterazică a MH de la cobai normali şi vaccinaţi cu B.C.G. *LN* = lecitinaza în preparate de la cobai normali; *LV* = lecitinaza în preparate de la cobai vaccinaţi B.C.G.; *FN* — tuberculofosfatidaza în preparate de la cobai normali; FV = tuberculofosfatidaza în preparate de la cobai vaccinaţi B.C.G.).

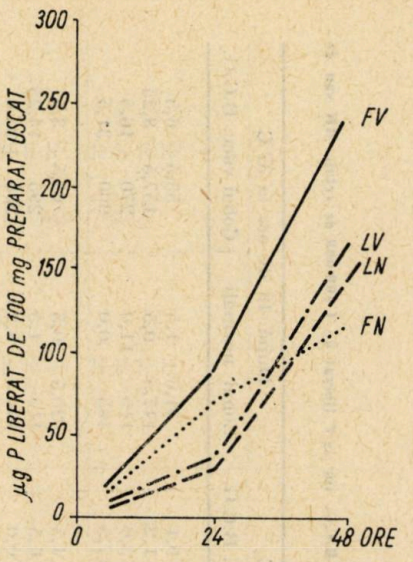


Fig.3. — Activitatea fosfoesterazică a preparatelor enzimatice de ficat de la cobai normali şi vaccinaţi B.C.G.
(aceeaşi legendă ca la figura nr. 2).

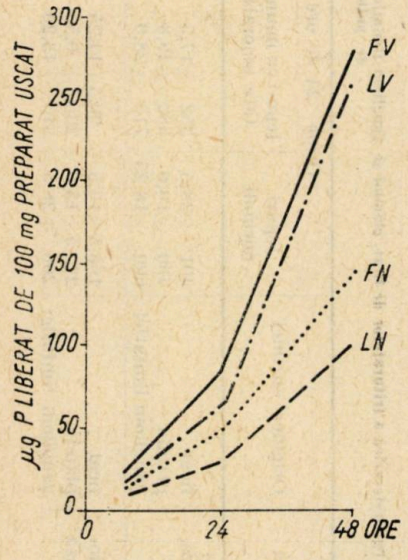


Fig.4. — Activitatea fosfoesterazică a preparatelor enzimatice de plămîn de la cobai normali şi vaccinaţi B.C.G.
(aceeaşi legendă ca la figura nr. 2).

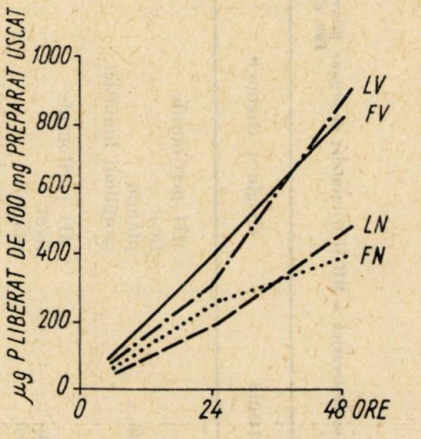


Fig. 5.— Activitatea fosfoesterazică a preparatelor enzimatice de ganglioni limfatici de la cobai normali şi vaccinaţi B.C.G.
(aceeaşi legendă ca la figura nr. 2).

Tabela nr. 1

Activitatea fosfoesterazică a MH și triturateior de organe provenite de la cobai normali și vaccinați B.C.G. (în μg P liberat de 1 000 000 de celule MH sau de 100 mg de pulbere de organe)

Enzima	Originea enzimei	După 24 de ore la 37°C		După 48 de ore la 37°C	
		Cobai normali	Cobai vacc. B.C.G.	Cobai normali	Cobai vacc. B.C.G.
Lecitinază	MH peritoneale	16,5± 2,5	28,4± 0,1	31,6± 1,5	55,5± 6,5
	ficat	33,5± 0,5	33,5± 1,25	147,5± 0,5	157,5± 8,25
	plămîn	32 ± 1,00	65 ± 2,0	110 ±11,0	270 ±16,5
	ganglioni limfatici	207 ± 6,0	317 ±17,5	483 ± 0,0	900 ±31,5
Tuberculo-fosfatidază	MH peritoneale	12 ± 0,5	34,3± 4,5	20,5± 0,5	65,5± 3,5
	ficat	72 ± 4,5	92,5± 6,5	115 ± 1,5	295 ±14,25
	plămîn	48 ± 2,75	87 ± 0,0	146,5± 8,25	280 ±23,0
	ganglioni limfatici	267 ±36,25	377 ±13,0	423 ±21,5	846 ±41,5

Tabela nr. 2

Activitatea fosfoesterazică a triturateior de ficat, plămîni și ganglioni limfatici provenite de la iepuri cu diferite tipuri de imunitate (în μg P liberat de 100 mg de pulbere de organe)

Enzima	Originea enzimei	După 24 de ore la 37°C			După 48 de ore la 37°C		
		Iepuri normali	Iepuri cu imunitate umorală	Iepuri cu imunitate celulară	Iepuri normali	Iepuri cu imunitate umorală	Iepuri cu imunitate celulară
Lecitinaza	ficat	401 ±38,5	352 ±17,5	757,5±21,25	692 ±46,5	655,5± 3,5	1085 ±37,0
	plămîn	430 ±10,0	582 ±49,8	942,5±48,5	913,5±16,5	1013 ±86,5	2105,5±67,5
	ganglioni limfatici	600 ±18,25	715 ±28,0	1065,5±36,0	1135 ±20,5	1098 ± 0,0	2650 ±212,0
Tuberculo-fosfatidaza	ficat	106,5±13,5	96,5±14,25	680 ±10,0	425,5±12,5	652 ±17,0	875 ±31,5
	plămîn	222,5±15,0	235,5± 0,5	475,5±25,5	415,5±62,5	435,5±55,5	588,5±22,25
	ganglioni limfatici	266 ±28,5	313 ±13,25	752 ±16,5	351,5± 9,25	649,5±36,0	1356,5±47,5

naţi cu B.C.G. După cum se observă, ambele tipuri de fosfoesteraze investigate sînt prezente atît la MH „normale" şi „imune", cît şi în toate tipurile de ţesuturi studiate. Se remarcă de asemenea că ambele activităţi fosfoesterazice sînt mai intense la preparatele enzimatice provenite de la cobaii imunizaţi contra tuberculozei. Activitatea crescută la animalele vaccinate este mai evidentă în cazul tuberculofosfatidazei, enzimă stimulată în mod deosebit prin prezenţa infecţiei vaccinante în organismele respective.

Activitatea fosfoesterazică este deosebit de intensă în cazul preparatelor enzimatice din ţesutul limfoido-histiocitar al ganglionilor limfatici. De asemenea, dacă se aproximează rezultatele obţinute cu suspensii de MH, ţinîndu-se seama de greutatea redusă a un milion de celule de MH supuse deshidratării, se poate afirma că cea mai intensă activitate lecitinazică şi fosfatidazică o manifestă celulele mononucleate ale exsudatului peritoneal.

În tabela nr. 2 sînt prezentate rezultatele determinărilor comparative ale activităţii fosfomonoesterazice a preparatelor de ficat, plămîni şi ganglioni limfatici provenite de la loturi de iepuri normali, vaccinaţi B.C.G. (cu imunitate celulară) şi imunizaţi antistafilococic (cu imunitate umorală). Din această tabelă se constată că toate tipurile de probe posedă atît activitate lecitinazică cît şi tuberculofosfatidazică. În ceea ce priveşte intensitatea activităţii fosfoesterazice, se observă că numai probele provenite de la iepurii vaccinaţi B. C. G. (imunitate de tip celular) manifestă o activitate deosebit de puternică. Preparatele enzimatice provenite de la iepurii cu imunitate de tip umoral (antistafilococică) prezintă o activitate lecitinazică şi tuberculofosfatidazică de intensitate apropiată cu aceea manifestată de martori.

Activitatea lecitinazică este — în toate cazurile — mai intensă decît cea tuberculofosfatidazică.

În ceea ce priveşte intensitatea activităţii fosfoesterazice în ansamblu, după cum se observă în tabela nr. 2, preparatele enzimatice provenite din ganglionii limfatici sînt cele mai active. Aceste preparate de ganglioni limfatici au o activitate fosfoesterazică deosebit de intensă în cazul iepurilor vaccinaţi cu B.C.G. (imunitate de tip celular).

DISCUŢII ŞI CONCLUZII

Rezistenţa macroorganismului faţă de infecţia tuberculoasă poate fi naturală sau dobîndită [5]. În ambele cazuri, o serie de elemente celulare mononucleate de origine histiocitară, posedînd capacităţi fagocitare („macrofage histiocitare"), manifestă o serie de însuşiri metabolice particulare, care le asigură o eficienţă antibacilară crescută. Printre aceste caractere metabolice deosebite se numără intensificarea activităţii fosfatazei acide şi a dehidrogenazei glucozo-*6*-fosfatului, ceea ce reflectă o eficienţă fagocitară mai mare [15], creşterea activităţii β-glucuronidazice, care traduce o mai mare capacitate de a fragmenta polizaharidele bacilare [21], intensificarea activităţii glicerofosfat-dehidrogenazei [15] şi a fosfoestera-

zelor, care indică un potenţial crescut al acestor celule de a metaboliza lipidele.

La animalele vaccinate B.C.G. (cobai şi iepuri), intensificarea activităţii fosfoesterazice este evidentă nu numai în cazul exsudatelor cu MH, ci şi la nivelul ţesuturilor limfoid-histiocitare, cu deosebire în ganglionii limfatici. Această activitate fosfoesterazică intensificată se manifestă atît asupra fosfolipidelor obişnuite (lecitine), cît şi asupra fosfolipidelor de origine bacilară (tuberculofosfatidul); însă nici în cazul lecitinazei C şi, mai ales, nici în cazul tuberculofosfatidazei nu se constată absenţa totală a enzimei în preparatele provenite de la animalele normale, ci numai o intensificare accentuată a activităţii lor în preparatele obţinute de la animalele vaccinate B.C.G.

La iepurii imunizaţi antistafilococic (imunitate umorală), preparatele din ţesuturile limfoid-histiocitare nu prezintă o intensificare a activităţii fosfoesterazice comparabilă cu cea observată la iepurii vaccinaţi B.C.G. (imunitate celulară). Modificările metabolice ale celulelor limfoid-histiocitare — printre care intensificarea funcţiei fosfoesterazice — par deci să aibă loc numai în cursul proceselor de imunitate celulară. O asemenea concluzie este sugerată şi de lucrările altor autori [5] [28] [29].

Pornind de la asemenea constatări şi ţinînd seama de faptul că infecţiile cu germeni facultativ intracelulari (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*) sînt însoţite de o stare de hipersensibilitate celulară, Mackaness [28] şi apoi Dubos [29] au emis ipoteza că imunitatea celulară ar fi expresia secundară a fenomenelor tisulare cauzate de hipersensibilitatea de tip întîrziat. Cu alte cuvinte, „inhibition of growth (of tubercle bacilli) would be due to the fact that the hypersensitive response alters the metabolism of the macrophages, and thereby creates within them an environment which is in someway inimical to bacteria" [29]. Conform acestei ipoteze, rezistenţa în tuberculoză (şi în alte infecţii celulare : listerioză, bruceloză) nu ar fi expresia unor procese imunologice specifice, ci numai consecinţa secundară a unei stări de hipersensibilitate celulară, care ar modifica proprietăţile metabolice ale macrofagelor histiocitare, elementele ce găzduiesc parazitul.

Se cunosc însă, în prezent, unele fapte care arată că rezistenţa la tuberculoză poate exista în afara stării de hipersensibilitate ; asemenea fenomene nu pot fi explicate prin ipoteza enunţată de către Mackaness.

În acest sens, MH de la animalele cu rezistenţă naturală la tuberculoză pot inhiba dezvoltarea micobacteriilor şi prezintă modificări metabolice similare celor constatate la MH de la animalele cu rezistenţă dobîndită la tuberculoză [5], [21], fără ca animalele natural rezistente să manifeste hipersensibilitate faţă de tuberculoproteină sau faţă de antigenele de *Listeria* ori *Brucella*. Se cunoaşte, de asemenea, faptul că starea de rezistenţă la infecţia tuberculoasă poate fi evidenţiată — la animalul vaccinat — mai de-vreme decît hipersensibilitatea tuberculinică [1]. În mod similar, lucrările lui Nègre [30] şi cele ale lui Weiss şi Dubos [31], care obţin imunizarea antituberculoasă cu ajutorul fosfatidelor bacilare, precum şi datele comunicate de Youmans [32] şi de Fregnan şi Smith [33], care folosesc

pentru imunizare alte fracţiuni bacilare, arată că este posibil să se obţină creşterea rezistenţei contra infecţiei bacilare fără dezvoltarea concomitentă a alergiei tuberculinice. În sfîrşit, în acelaşi sens pledează, pe de o parte, posibilitatea de a transfera în serie rezistenţa la tuberculoză, în mod pasiv, cu ajutorul MH „imune", fără a realiza şi o sensibilizare la tuberculină [8], iar pe de altă parte imposibilitatea de a evidenţia creşterea rezistenţei contra infecţiei bacilare la animale la care s-a indus starea de hipersensibilitate întîrziată prin inocularea de tuberculoproteină înglobată în adjuvant Freund.

Datele menţionate mai sus nu permit deci acceptarea în forma actuală a ipotezei Macknass-Dubos, conform căreia modificările metabolice ale MH „imun", care îi măresc eficienţa antibacilară, ar fi datorite stării de hipersensibilitate celulară provocată de infecţia bacilară. Oricare ar fi însă mecanismele de inducţie a acestor transformări metabolice la nivelul elementelor limfoid-histiocitare, ele par să fie specifice stărilor de imunitate celulară, neputînd fi decelate la elemente similare, provenite de la animale cu imunitate umorală.

În *concluzie* alături de modificările metabolice care realizează la nivelul macrofagelor histioide intensificarea proceselor de fagocitoză, de detoxifiere celulară, de hidroliză a polizaharidelor şi de degradare oxidativă a lipidelor, starea de imunitate antibacilară este însoţită şi de o creştere a activităţii fosfoesterazice a ţesuturilor limfoid-histiocitare, care prezintă o intensificare a capacităţii de a dezagrega fosfolipidele obişnuite (lecitine) şi fosfatidul de origine bacilară.

Laboratorul de biochimie şi fiziologie bacteriană
al Institutului clinic de ftiziologie,
Şos. Viilor nr. 90, Bucureşti

Prezentată la redacţie la 3 februarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. A. R. Rich, *The pathogenesis of tuberculosis*, Edit. Ch. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1951.
2. Eug. Păunescu, *Modificări enzimatice ale macroorganismului în cursul proceselor tuberculoase*, Ftiziologia, *1*, 47 (1961).
3. Eug. Păunescu, *Acţiunea serului imun antituberculoproteină asupra sensibilităţii celulare de tip întîrziat*, Microbiol., epidemiol., parazitol., *4* (1965).
4. M. B. Lurie, *Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis. The mobilization of mononuclear phagocytes in normal and immunized animal and their relative capacities for division and phagocytosis*, J. exp. Med., **69**, 579 (1939).
5. M. B. Lurie, *Resistance to tuberculosis. Experimental studies in native and acquired resistance to tuberculosis*, Harvard Univ. Press, Cambridge, 1964.
6. Al. Eskenasy, Eug. Păunescu, *Dinamica morfologică a reacţiilor peritoneale ale cobaiului vaccinat BCG, sub acţiunea extractelor lipidice bacilare*, Probleme de tuberculoză, V, 79 (1964).
7. J. Fong, P. Schneider, S. S. Elberg, *Studies on tubercle bacillus-monocyte relationship. I. Quantitative analysis of effect of serum of animals vaccinated with BCG, upon bacterium-monocyte system*, J. exp. Med., **104**, 455 (1956).
8. J. Fong, D. Chin, S. S. Elberg, *Studies on tubercle bacillus-hystiocyte relationship. V. Passive transfer of cellular resistance*, J. exp. Med., **115**, 475 (1962).

9. J. S. Najarian, J. D. Feldman, *Passive transfer of tuberculin sensitivity by tritiated thymidine-labeled lymphoid cells*, J. exp. Med., **114**, 779 (1961).
10. G. Gillissen, *La définition sérologique des anticorps sessils par rapport à la réaction tuberculinique*, Rev. d'Immunol., **27**, 43 (1963).
11. S. O. Freedman, R. Turcotte, A. J. Fish, A. H. Sehon, *The in vitro detection of „cell-fixed" hemagglutinating antibodies to tuberculin purified protein derivative in humans*, J. Immunol., **90**, *1*, 52 (1963).
12. T. A. Witten, W. L. Sang, M. Killian, *Reactions of lymphocytes with purified protein derivative conjugated with fluorescein*, Science, **142**, 596 (1963).
13. Eug. Păunesco, A. Ciolac-Negoescu, G. Pisică, *Influence du Tween 80 et de la pénicilline sur les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire des mycobactéries*, Rev. roum. Biochim., **1**, 77 (1964).
14. H. J. Akiyama, J. Fong, *Interaction of lysates of histiocytes and tubercle bacilli*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **109**, 711 (1962).
15. Eug. Păunesco, E. Hadîrcă, *Réactivité biochimique et immunologique du macrophage histioïde en tuberculose. I. Activité déhydrogénasique et phosphatasique*, Rev. roum. Biochim., **1**, 183 (1964).
16. Eug. Păunesco, *Réactivité biochimique et immunologique du macrophage histioïde en tuberculose. II. Différences de composition chimique entre les macrophages de l'animal normal et de l'animal vacciné par le BCG*, Rev. roum. Biochim., **1**, 327 (1964).
17. H. Bloch, *Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms*, J. exp. Med., **91**, 197 (1950).
18. H. Kraut, H. Burger, *Über die Spaltbarkeit von Tuberkelfett durch Lipasen. II. Mitteilung*, Z. Physiol. Chem., **253**, 105 (1938).
19. Eug. Păunescu, *Modificări enzimatice ale macroorganismului în cursul proceselor tuberculoase*, Ftiziologia, **8**, 47 (1961).
20. Eug. Păunescu, *Structura infracelulară a micobacteriilor*, Ftiziologia, **12**, *1*, 1 (1965).
21. C. A. Colwell, A. R. Hess, M. Tavaststjerna, *Mononuclear cells from animals of divergent susceptibility to tuberculosis. I. Enzyme studies*, Amer. Rev. Resp. Dis., **88**, 37 (1963).
22. A. M. Dannenberg, W. E. Bennett, *Hydrolases of mononuclear exsudate cells and tuberculosis. I. Exudate characteristics, esterases, proteinasses and lipase*, Arch. Pathol., **76**, 581 (1963).
23. B. Gerstl, R. Tennant, *Enzymes as factors in resistance to tuberculosis*, Amer. Rev. Tuberc., **46**, 600 (1942).
24. B. Gerstl, R. Tennant, O. Pelzman, *Enzymes as factors in resistance to tuberculosis. IV. Effect of liver enzymes on tubercle phosphatide*, Yale J. Biol. Med., **17**, 455 (1945).
25. C. Seeber, *Der Phosphatid-Kaolin-Agglutinationstest*, Mtschr. Tbk. Pathol., **8**, 245 (1963).
26. G. Algeorge, Eug. Păunescu, M. Stoian, *Cercetări asupra seroreacției de caolinoaglutinare cu antigen fosfatidic pentru aprecierea evolutivității leziunilor tuberculoase*, Microbiol., epidemiol., parazitol., *4*, 321 (1964).
27. C. E. Ballou, E. Vilkas, E. Lederer, *Structural studies on the myoinositol phospholipids of* Mycobacterium tuberculosis (*var.* bovis, *strain BCG*), J. biol. Chem., **238**, 69 (1963).
28. G. B. Mackaness, *The immunological basis of acquired cellular resistance*, J. exp. Med., **120**, 105 (1964).
29. R. J. Dubos, *Acquired immunity to tuberculosis*, Amer. Rev. Resp. Dis., **90**, 505 (1964).
30. L. Nègre, *Résistance antituberculeuse sans allergie conféré aux animaux de laboratoire par l'antigène méthylique. Etude de sa durée et de l'action préventive de ce produit associée à celle du BCG*, Ann. Inst. Pasteur, **83**, 429 (1952).
31. D. W. Weiss, R. J. Dubos, *Antituberculous immunity induced by methanol extracts of tubercle bacilli. Its enhancement by adjuvants*, J. exp. Med., **103**, 73 (1956).
32. A. S. Youmans, G. P. Youmans, *Further studies on a labile immunogenic particulate substance isolated from* Mycobacterium tuberculosis, J. Bact., **87**, 278 (1964).
33. G. B. Fregnan, D. W. Smith, *Immunogenicity and allergenicity in guinea pigs of a defatted mycobacterial vaccine and its fractions*, Amer. Rev. Resp. Dis., **87**, 877 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 221–224 (1965)

EXPLORAREA EXOCOLULUI UTERIN PRIN EXOSMOZA ELECTROLIȚILOR*

ALEXANDRINA POPESCU și MIOARA CÂRSTEANU

618.1 : 541.1

Rezumat. — Prin determinări conductometrice s-a urmărit variația exosmozei electroliților din 135 de exocoluri uterine, în stare normală și patologică. S-a constatat că exocolurile care au prezentat valori ale exosmozei electroliților cuprinse între 0 și $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ au fost normale clinic, colposcopic și anatomopatologic. Exocolurile care au prezentat valori ale exosmozei electroliților mai mari de $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ au fost exocoluri patologice : exocolurile cu modificări benigne, diagnosticate clinic, colposcopic și anatomopatologic, prezintă valori superioare, dar apropiate de $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$, iar cele cu modificări maligne, diagnosticate clinic, colposcopic și anatomopatologic prezintă valori ale exosmozei electroliților mult superioare lui $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$.

Metodele de diagnosticare a stărilor funcționale ale epiteliului exocolului uterin se bazează pe explorarea lui clinică, *in situ*, și a țesutului prelevat. Metodele enzimologice, ca și cele anatomopatologice, necesită prelevarea de țesut ; prelucrarea lui creează artefacte, iar interpretarea se realizează cu aparatură tehnică complicată și într-un timp destul de îndelungat.

Integritatea membranei bazale, care are valoare importantă pentru majoritatea anatomopatologilor în definirea epiteliomului intraepitelial, se pare că trebuie privită cu rezervă, ținînd seama de rezultatele cercetărilor recente cu ajutorul microscopiei electronice [1].

Testul cu iod al lui W. Schiller [2] poate da indicații prețioase, alături de colposcopie — metodă modernă de investigație a colului uterin —, dar pe de o parte se bazează pe aprecierea subiectivă a colorației epiteliului exocolului, rezultată din interacțiunea soluției de iod aplicate pe col cu glicogenul epitelial, iar pe de altă parte acest test s-a dovedit a nu fi specific.

În lucrări anterioare [3], [4], [5], în care s-a urmărit endosmoza iodului pe exocoluri normale și patologice, s-a arătat că iodul pătrunde în exocol proporțional cu concentrația soluției și cu timpul de contact și că permeabilitatea exocolului uterin variază în raport cu starea lui funcțională, fiind cu atît mai mare cu cît modificările patologice sînt mai accen-

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **2**, 2 (1965) în limba engleză.

tuate. Tot în lucrări anterioare [6], [7] a fost elaborată o metodă conductometrică de măsurare a exosmozei electroliţilor din piele, *in situ*, în care s-a determinat intensitatea exosmozei electroliţilor din pielea umană în stare normală şi patologică. Rezultatele obţinute în aceste lucrări justificau extinderea cercetărilor asupra mucoasei exocolului uterin, avînd în vedere atît frecvenţa cancerului şi a altor maladii la acest nivel, cît şi faptul că epiteliul exocolului uterin, spre deosebire de epiderm, nu are un strat cornos cheratinizat, care să îngreuieze exosmoza electroliţilor din ţesut. Era deci de aşteptat ca modificările permeabilităţii şi echilibrului electroliţilor din ţesut, frecvente în diferite stări patologice ale colului, să fie însoţite de modificări ale exosmozei, devenind astfel sesizabile prin măsurarea acesteia.

Date fiind toate aceste consideraţii în lucrarea de faţă am urmărit felul cum variază exosmoza electroliţilor din exocolurile normale şi din cele patologice.

Metoda utilizată a fost cea descrisă într-o lucrare anterioară [8]: pe exocolul uterin, spălat în prealabil cu apă distilată pentru eliminarea eventualelor secreţii şi uscat cu un curent de aer cald, se aplică un tub de sticlă deschis la ambele capete, lung de 20 cm şi cu diametrul interior de 3 cm; o uşoară apăsare asigură etanşeitatea legăturii. Se introduc apoi în tub 10,0 ml de apă bidistilată cu conductibilitatea electrică specifică de ordinul $20 \cdot 10^{-7}\ \Omega^{-1}$. După 10 minute de la introducerea apei în tub, printr-o uşoară înclinare a tubului se trece apa într-un pahar Berzelius şi se măsoară conductibilitatea ei specifică cu ajutorul unui conductoscop şi al unei celule conductometrice de tip Arrhenius. Creşterea sau scăderea exosmozei va fi deci direct proporţională cu creşterea sau scăderea conductibilităţii soluţiilor respective, fapt care permite exprimarea intensităţii exosmozei prin valorile conductometrice corespunzătoare.

În condiţiile menţionate s-au efectuat 198 de determinări pe 135 diferite coluri uterine, dintre care: 62 coluri normale, 17 coluri normale însoţite de sarcină, 24 coluri patologice cu modificări benigne şi 32 coluri cu modificări maligne.

Valorile conductometrice ale soluţiilor rezultate din exosmoza electroliţilor exocolului uterin au variat între $233.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ şi $20.815.10^{-7}\ \Omega^{-1}$.

Exocolurile care au prezentat valori ale exosmozei electroliţilor cuprinse între 0 şi $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ au fost normale clinic, colposcopic şi anatomopatologic. Determinările repetate la unele din aceste exocoluri, la diferite intervale de timp, indică valori ce se încadrează între aceleaşi limite. Determinările efectuate pe exocoluri normale ale uterelor gravide în cazurile cercetate de noi, dau la orice vîrstă valori ale exosmozei sub $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$.

Din cele 79 de cazuri normale studiate, numai 5 cazuri dau valori ale exosmozei mai mari de $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$.

Exocolurile care au prezentat valori ale exosmozei electroliţilor mai mari de $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ au fost exocoluri patologice. Determinările efectuate pe exocoluri cu modificări benigne diagnosticate clinic, colposcopic şi anatomopatologic, prezintă valori ale exosmozei electroliţilor superioare, dar apropiate de $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$. Din 24 de exocoluri cu modificări

benigne, 8 dau valori sub $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$, dar totuși apropiate de această cifră.

Determinările efectuate pe exocoluri cu modificări maligne, diagnosticate clinic, colposcopic și anatomopatologic, prezintă valori ale exosmozei electroliților cu mult mai mari decît $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ ajungînd pînă la $20.815.10^{-7}\ \Omega^{-1}$, în funcție de stadiul de avansare a cancerului. Determinări repetate la unele din aceste exocoluri, la diferite intervale de timp, indică valori ce se încadrează între aceleași limite.

Din 32 de exocoluri neoplazice, în urma efectuării exosmozei, numai 2 au condus la valori conductometrice sub $2.500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$. La aceste 2 cazuri, determinările de exosmoză au fost făcute după biopsie.

Momentul optim pentru determinarea exosmozei electroliților exocolului uterin neoplazic este cel anterior biopsiei, de unde rezultă și caracterul metodei de depistare a cancerului epiteliului exocolului uterin.

Cancerul corpului uterin nu afectează exosmoza electroliților din exocol.

În tabela nr. 1 sînt prezentate valorile conductometrice limită ale exosmozei electroliților din diferite exocoluri uterine, media tuturor determinărilor efectuate și abaterile medii ale rezultatelor obținute.

Tabela nr. 1

Valorile conductometrice limite și medii ale exosmozei electroliților din exocoluri normale și patologice ($\times 10^{-7}\ \Omega^{-1}$)

Felul cazurilor	Nr. cazurilor	Limita inferioară	Limita superioară	Media (X)	Abaterea standard (s)	Intervalele de confidență corespunzătoare (X ± 2,6 s)
Normale	79	233	5253	1371	101	1371 ± 262
Benigne	24	1064	6272	2746	273	2746 ± 710
Maligne	32	1291	20815	10582	969	10582 ± 2520

Din calculele noastre rezultă că diferențele dintre valorile medii corespunzătoare celor trei categorii de cazuri analizate, sînt distinct semnificative, probabilitatea de transgresiune fiind numai de 1% ($P = 0{,}01$). În ultima coloană a tabelei sînt date intervalele în interiorul cărora este de așteptat să fie cuprinse 99% din valorile individuale determinate experimental.

Datele obținute în această lucrare ne fac să credem că metoda descrisă poate fi aplicată cu succes în clinică, alături de celelalte metode cunoscute, la depistarea *in situ* a exocolurilor patologice, în special a celor neoplazice, avînd avantajul de a fi o metodă comodă, rapidă și obiectivă.

Maternitatea Filantropia, București
și Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

Prezentată la redacție la 21 ianuarie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. G. K. Ober, *Histologie de l'épitelium cervical normal et pathologique*, Rev. franc. gynec. obstetr., *9—10*, 593 (1961).
2. W. Schiller, *Untersuchungen zur Entstehung der Geschwülste-Collumcarcinom des Uterus*, Wirch. Archiv, **263**, 279, 1927.
3. E. Macovschi, A. Mihăescu, A. Popescu, *Procedeu pentru măsurarea endosmozei iodului în colul uterin*, St. cerc. biochim., **5**, 113 (1962).
4. A. Popescu, A. Mihăescu, *Variațiile valorilor endosmozei iodului în colul uterin normal* (sub tipar).
5. A. Popescu, A. Mihăescu, *Variațiile valorilor endosmozei iodului în colul uterin patologic* (sub tipar).
6. E. Macovschi, S. Comoroșan, *Cercetări conductometrice asupra electroliților din piele*, St. cerc. chimie, **IV**, 271 (1956).
7. E. Macovschi, S. Comoroșan, *Konduktometrische Untersuchungen der Elektrolytexosmose aus der Haut*, Ärztliche Forschung, **12**, 2 (1958).
8. E. Macovschi, M. Cârsteanu, A. Popescu, *Metodă pentru determinarea exosmozei electroliților din colul uterin*, St. cerc. biochim., **7**, 151 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 225–234 (1965)

CERCETĂRI ASUPRA RESPIRAȚIEI CELULARE ÎN INTOXICAȚIA EXPERIMENTALĂ CU ARSEN *

ALFRED SPORN și ILEANA DINU

577.15

Rezumat. — Pe 80 de șobolani albi, tineri, împărțiți în 10 loturi, s-a cercetat acțiunea arsenitului și arsenatului de sodiu — administrați timp de 4 și 9 săptămîni, în doze de 1 și 10 ppm arsen — asupra creșterii șobolanului alb și a consumului de O_2 a omogenatului hepatic, în prezența a diferite substrate. Rezultatele obținute arată că arsenitul și arsenatul de sodiu în doze de 10 ppm au determinat o scădere a eficienței proteice, o creștere a respirației endogene și a consumului de O_2 al omogenatului hepatic, în prezența glutamatului și malatului ca substrate. Nu s-au înregistrat modificări ale consumului de O_2 în prezența succinatului. La doza de 1 ppm arsenit se obține o creștere a respirației endogene și a consumului de O_2 în prezența glutamatului și malatului în primele 20 de minute de respirație.

Într-o lucrare anterioară [10] s-a stabilit că arsenitul și arsenatul de sodiu, administrate timp de 6 săptămîni la șobolani albi, tineri, în doză de 10 ppm, determină o creștere semnificativă a activității succin-dehidrogenazei hepatice. Succin-dehidrogenaza fiind numai o componentă a unui sistem enzimatic implicat în întregul lanț respirator, modificarea activității sale nu este suficientă pentru aprecierea gradului de nocivitate a arsenului. Din acest punct de vedere prezintă interes determinarea influenței pe care o exercită dozele mici de arsen, apropiate de limitele admise actualmente în alimentație, asupra consumului total de oxigen al omogenatului hepatic.

Influența pe care arsenul o exercită *in vitro* asupra proceselor de respirație celulară și de fosforilare oxidativă este bine cunoscută [4–8] [12]. Datele bibliografice cercetate nu dau însă indicații referitoare la influența arsenului administrat *per os*, în doze mici, asupra proceselor de respirație celulară.

Pentru elucidarea acestui aspect al problemei, în cercetarea de față am studiat influența administrării *per os* a dozelor mici de arsen asupra consumului de oxigen al omogenatului hepatic, comparativ cu efectul exercitat de adaosul de arsen *in vitro* pe diferite substrate.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 2 (1965), în limba engleză.

MATERIAL SI METODE

Experienţele s-au efectuat în două serii, pe şobolani albi, tineri, proveniţi din aceeaşi generaţie, de vîrstă şi greutate apropiată. În prima experienţă arsenitul şi arsenatul de sodiu s-au administrat în doze de 1 şi 10 ppm (calculat în mg arsen la kg hrană), timp de 4 săptămîni, după cum urmează : lotul I — martor ; lotul II — arsenat 1 ppm ; lotul III — arsenat 10 ppm ; lotul IV — arsenit 1 ppm ; lotul V — arsenit 10 ppm.

În a doua serie experimentală, pentru a verifica reproductibilitatea rezultatelor şi a obţine elemente noi privind dinamica modificărilor produse de arsen, acesta s-a administrat în aceleaşi condiţii experimentale ca în prima serie, însă timp de 9 săptămîni.

În ambele experienţe s-a urmărit influenţa arsenului asupra creşterii (cîştigul săptămînal în greutate, ingesta, eficienţa proteică).

La sfîrşitul fiecărei experienţe animalele au fost sacrificate prin decapitare, urmărindu-se consumul de oxigen pe omogenat hepatic, prin metoda manometrică convenţională Warburg.

Mediul de reacţie (2 ml) a avut următoarea compoziţie : tampon fosfat de potasiu mM pH 13 ; sulfat de magneziu 6,7 mM ; clorură de potasiu 25 mM ; acid adenozintrifosforic 0,1 mM ; citocrom *c* 0,02 mM. În compartimentul principal s-au pipetat 0,5 ml de omogenat hepatic 10% în manitol 0,25 M. În diverticul s-a pipetat 0,1 ml de substrat 10^{-2}M. După termoechilibrarea la 30°C, s-a răsturnat substratul din diverticul şi s-a măsurat consumul de O_2 din 10 în 10 minute, timp de o oră. Rezultatele obţinute s-au raportat la 50 mg de ficat umed şi la un g de proteină hepatică. Proteinele s-au dozat prin metoda biuretului, modificată de Aldridge [1].

S-a măsurat respiraţia endogenă, precum şi consumul de O_2, folosindu-se ca substrate succinatul, glutamatul şi malatul.

Alegerea succinatului ca substrat s-a făcut ţinîndu-se seama de faptul că, după datele din literatură, el reprezintă unicul substrat a cărui oxidare este stimulată de adaosul de arsenit. Acţiunea de stimulare a oxidării succinatului se observă la nivele mai mari de 1 mM de arsenit [2].

În alegerea celorlalte substrate pentru măsurarea consumului de oxigen s-a ţinut seama de clasificarea substratelor legate de NAD bazată pe sensibilitatea lor faţă de arsenit [2]. După această clasificare, în primul grup intră alfa-cetoglutaratul, a cărui oxidare este foarte sensibilă la arsenit, inhibiţia fiind maximă la o concentraţie mai mică de 5×10^{-6}M (0,005 mM). Efectul arsenitului asupra alfa-cetoglutaratului este uşor de explicat, ţinînd seama de faptul că activitatea enzimei alfa-cetoglutaraza este puternic inhibată de arsenit [9].

În al doilea grup de substanţe, de sensibilitate mai mică faţă de arsenit decît alfa-cetoglutaratul, intră malatul şi citratul, a căror oxidare prezintă o inhibiţie maximă la un nivel de aproximativ 2×10^{-5}M (0,02 mM).

Ca atare, în cercetarea de faţă am ales ca reprezentant al primului grup glutamatul, iar pentru cel de-al doilea grup malatul.

Influenţa pe care arsenul o exercită *in vitro* asupra consumului de O_2, cu substratele mai sus menţionate, s-a determinat pe omogenatul hepatic al animalelor din lotul martor, adăugînd în mediul de incubaţie arsenit şi arsenat de sodiu în concentraţie de 3 mM.

REZULTATE

Influenţa arsenului asupra creşterii şobolanului alb. Greutatea finală a loturilor care au primit arsenat şi arsenit în doză de 1 şi 10 ppm a fost apropiată de aceea a lotului martor, în ambele experienţe. Astfel,

în prima experiență, la o greutate inițială a loturilor care oscila între 42,9 ± 0,46 și 43,0 ± 0,42, se ajunge la o greutate finală care oscilează între 123 ± 5,14 și 129 ± 5,15. La 9 săptămîni, greutatea finală a oscilat între 188 ± 15,3 și 211 ± 20,7, fără ca diferențele între loturi să fie semnificative din punct de vedere statistic.

Ingesta de alimente a fost ușor crescută la loturile care au primit arsen în prima experiență, fără ca diferențele față de lotul martor să fie semnificative din punct de vedere statistic. În a doua experiență ingesta de alimente la loturile care au primit arsen a fost apropiată de cea a lotului martor.

Eficiența proteică (cîștig în greutate la g de proteină ingerată) a fost scăzută la loturile care au primit arsen timp de 4 săptămîni și nemodificată după 9 săptămîni de administrare a arsenului (experiența a II-a). Analizînd eficiența proteică în dinamică, rezultă că după două și patru săptămîni ea este semnificativ scăzută la loturile care au primit 10 ppm arsenat și arsenit. Astfel, în timp ce lotul martor prezintă pe perioada de 4 săptămîni o eficiență proteică de 1,66 ± 0,05, lotul care a primit 10 ppm arsenat are o eficiență proteică de 1,50 ± 0,06 ($p < 0,05$), iar lotul care a primit 10 ppm arsenit 1,42 ± 0,06 ($p < 0,003$). Eficiența proteică socotită pe o perioadă de 6, respectiv 9 săptămîni, nu prezintă diferențe semnificative față de lotul martor (tabela nr. 1).

Tabela nr. 1

Influența arsenului asupra eficienței proteice

Loturile	După 2 săptămîni			După 4 săptămîni			După 6 săptămîni			După 9 săptămîni		
	Medie	E.S.*	P**	Medie	E.S.	P.	Medie	E.S.	P.	Medie	E.S.	P
I. Martor	1,98	0,06		1.66	0,05		1,52	0,08		1,10	0,07	
II. Arsenat 1 ppm	1,89	0,09	>0,05	1,54	0,06	>0,05	1,35	0,15	>0,05	1,11	0,08	>0,05
III. Arsenat 10 ppm	1,70	0,09	<0,01	1,50	0,06	<0,05	1,28	0,10	>0,05	1,02	0,05	>0,05
IV. Arsenit 1 ppm	1,79	0,08	>0,05	1,53	0,06	>0,05	1,33	0,11	>0,05	1,12	0,08	>0,05
V. Arsenit 10 ppm	1,71	0,07	<0,005	1,42	0,06	<0,003	1,18	0,08	>0,05	0,98	0,06	>0,05

* E.S. = eroarea standard.
**P = testul Pearson.

Greutatea ficatului nu a fost influențată de administrarea arsenului în nici una din experiențele noastre.

Conținutul în proteine al ficatului prezintă o tendință de scădere la loturile care au primit arsen, în prima experiență, fără ca diferențele față de lotul martor să fie semnificative din punct de vedere statistic. În a doua experiență conținutul în proteine al ficatului la loturile experimentale este apropiat de cel al lotului martor.

Respirația endogenă a omogenatului hepatic. Administrarea timp de 4 săptămîni de 1 ppm arsenat și arsenit de sodiu nu a influențat consumul total de oxigen în 60 de minute. Astfel, valorile medii ale lotului

martor raportate la g proteină hepatică au fost de 3,94 ± 0,37 microlitri O_2, iar la loturile experimentale de 3,92 ± 0,42 şi respectiv 4,08 ± 0,19 microlitri. La doza de 10 ppm arsenat de sodiu, respiraţia endogenă atinge 4,80 ± 0,19 microlitri, ceea ce reprezintă o creştere de 21%. În cazul arsenitului de sodiu în doză de 10 ppm, respiraţia endogenă este de 5,04 ± 0,42 microlitri O_2, ceea ce reprezintă o creştere de 27%. În ambele cazuri, diferenţele faţă de lotul martor sînt semnificative din punct de vedere statistic.

Administrarea arsenului timp de 9 săptămîni determină modificări asemănătoare în respiraţia endogenă, diferenţele faţă de lotul martor fiind mai evidente (32% în cazul dozei de 10 ppm arsenat şi 42% în cazul arsenitului).

Analizînd variaţia vitezei respiraţiei timp de 60 de minute (fig. 1), rezultă că şi doza de 1 ppm arsenit de sodiu a determinat apariţia unor modificări în respiraţia endogenă. Astfel, la lotul care a primit 1 ppm de arsenit se înregistrează, din primele 10 minute, o creştere a respiraţiei endogene, care la 20 de minute atinge nivelul total cu 10 ppm. După 20 de minute se înregistrează o scădere bruscă a respiraţiei endogene, care atinge nivelul lotului martor la 40 de minute. La doza de 10 ppm de arsenit, respiraţia endogenă se menţine crescută timp de 50 de minute. În cazul arsenatului, doza de 10 ppm determină o creştere a respiraţiei endogene, care se menţine liniară în decursul celor 60 de minute. La doza de 1 ppm de arsenat se înregistrează după 20 de minute o creştere a respiraţiei, asemănătoare cu cea observată la doza de 10 ppm.

Respiraţia omogenatului hepatic în prezenţa succinatului ca substrat. Administrarea arsenului nu a influenţat respiraţia omogenatului hepatic în prezenţa succinatului ca substrat. Astfel, în prima experienţă, valorile consumului total de oxigen în 60 de minute, raportate la g de proteină hepatică, oscilează între 16,4 ± 1,17 şi 17,3 ± 1,43 microlitri O_2, o valoare mai crescută înregistrîndu-se doar la doza de 10 ppm de arsenit (23,2 ± 3,74), fără însă ca diferenţele faţă de lotul martor să fie semnificative din punct de vedere statistic. În a doua experienţă valorile sînt apropiate, oscilînd între 17,1 ± 0,82 şi 19,4 ± 1,9.

Adaosul arsenitului de sodiu *in vitro* (3×10^{-3} M) a produs o scădere importantă a respiraţiei, de la 17,3 ± 1,43 la 6,53 ± 0,43, adică cu 63%. Adaosul arsenatului a produs doar o foarte uşoară scădere a respiraţiei, fără ca diferenţele faţă de lotul martor să fie semnificative.

În ceea ce priveşte viteza respiraţiei în timp, în prezenţa succinatului curbele obţinute pe loturile care au primit arsen nu prezintă diferenţe faţă de curba lotului martor.

Respiraţia omogenatului hepatic în prezenţa glutamatului ca substrat. În prima experienţă, după 4 săptămîni de administrare a arsenului, consumul total de oxigen la loturile care au primit arsen nu diferă semnificativ faţă de lotul martor, valorile oscilînd între 4,69 ± 0,67 şi 7,05 ± 0,30 microlitri O_2 pe g de proteină hepatică.

În a doua experienţă, loturile care au primit arsen timp de 9 săptămîni prezintă valori mai crescute ale respiraţiei celulare, care sînt semnificative numai la lotul care a primit 10 ppm de arsenit de

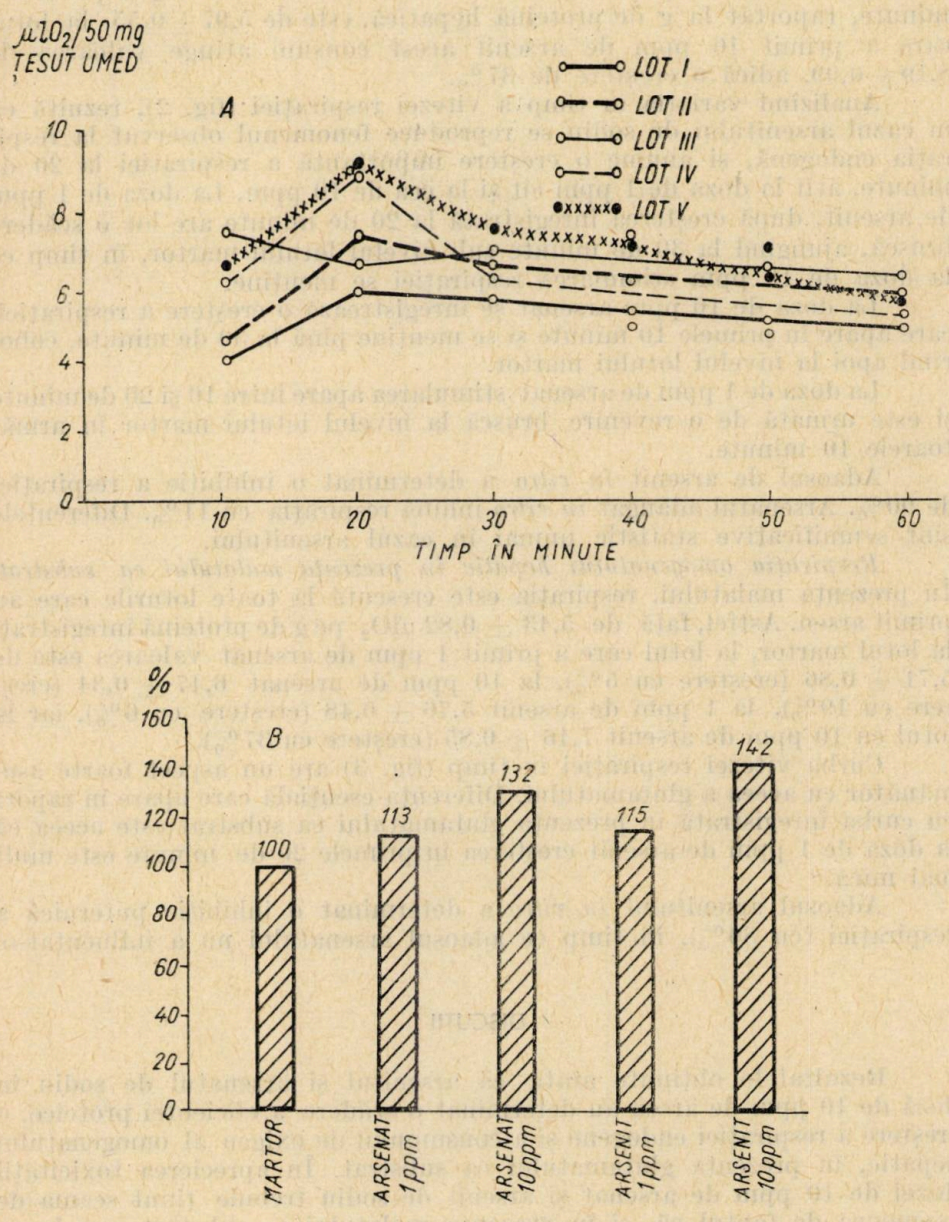


Fig.1. — INFLUENȚA ADMINISTRĂRII ARSENULUI ASUPRA RESPIRAȚIEI ENDOGENE A OMOGENATULUI HEPATIC.

A: Variația în timp a vitezei respirației. *B*: Consumul total de O_2 în 60 de minute, în % față de martor.

sodiu. Astfel, în timp ce la lotul martor consumul de oxigen pe 60 de minute, raportat la g de proteină hepatică, este de $5,97 \pm 0,55$, la lotul care a primit 10 ppm de arsenit acest consum atinge valoarea de $8,19 \pm 0,99$, adică o creştere de 37%.

Analizînd variaţia în timp a vitezei respiraţiei (fig. 2), rezultă că în cazul arsenitului de sodiu se reproduce fenomenul observat la respiraţia endogenă, şi anume o creştere importantă a respiraţiei la 20 de minute, atît la doza de 1 ppm cît şi la cea de 10 ppm. La doza de 1 ppm de arsenit, după creşterea înregistrată la 20 de minute are loc o scădere bruscă, ajungînd la 30 de minute sub nivelul lotului martor, în timp ce la doza de 10 ppm stimularea respiraţiei se menţine.

La doza de 10 ppm arsenat se înregistrează o creştere a respiraţiei, care apare în primele 10 minute şi se menţine pînă la 30 de minute, coborînd apoi la nivelul lotului martor.

La doza de 1 ppm de arsenat stimularea apare între 10 şi 20 de minute şi este urmată de o revenire bruscă la nivelul lotului martor în următoarele 10 minute.

Adaosul de arsenit *in vitro* a determinat o inhibiţie a respiraţiei de 90%. Arsenatul adăugat *in vitro* inhibă respiraţia cu 11%. Diferenţele sînt semnificative statistic numai în cazul arsenitului.

Respiraţia omogenatului hepatic în prezenţa malatului ca substrat. În prezenţa malatului, respiraţia este crescută la toate loturile care au primit arsen. Astfel, faţă de $5,43 \pm 0,82$ μlO_2 pe g de proteină înregistraţi la lotul martor, la lotul care a primit 1 ppm de arsenat valoarea este de $5,71 \pm 0,86$ (creştere cu 5%), la 10 ppm de arsenat $6,47 \pm 0,34$ (creştere cu 19%), la 1 ppm de arsenit $5,76 \pm 0,48$ (creştere cu 6%), iar la lotul cu 10 ppm de arsenit $7,46 \pm 0,85$ (creştere cu 37%).

Curba vitezei respiraţiei în timp (fig. 3) are un aspect foarte asemănător cu aceea a glutamatului. Diferenţa esenţială care apare în raport cu curba înregistrată în prezenţa glutamatului ca substrat este aceea că la doza de 1 ppm de arsenit creşterea în primele 20 de minute este mult mai mică.

Adaosul arsenitului *in vitro* a determinat o inhibiţie puternică a respiraţiei (cu 80%), în timp ce adaosul arsenatului nu a influenţat-o.

DISCUŢII

Rezultatele obţinute arată că arsenitul şi arsenatul de sodiu în doză de 10 ppm de arsen au determinat o scădere a eficienţei proteice, o creştere a respiraţiei endogene şi a consumului de oxigen al omogenatului hepatic, în prezenţa glutamatului ca substrat. În aprecierea toxicităţii dozei de 10 ppm de arsenat şi arsenit de sodiu trebuie ţinut seama de asemenea de faptul că, şi în prezenţa malatului ca substrat, are loc o creştere a consumului de O_2 cu 19% la lotul care a primit 1 ppm şi cu 37% la 10 ppm. Aspectul mai puţin marcat al modificărilor înregistrate în cazul folosirii malatului ca substrat ar putea fi explicat prin sensibilitatea sa mai redusă faţă de arsen în raport cu aceea a glutamatului [2].

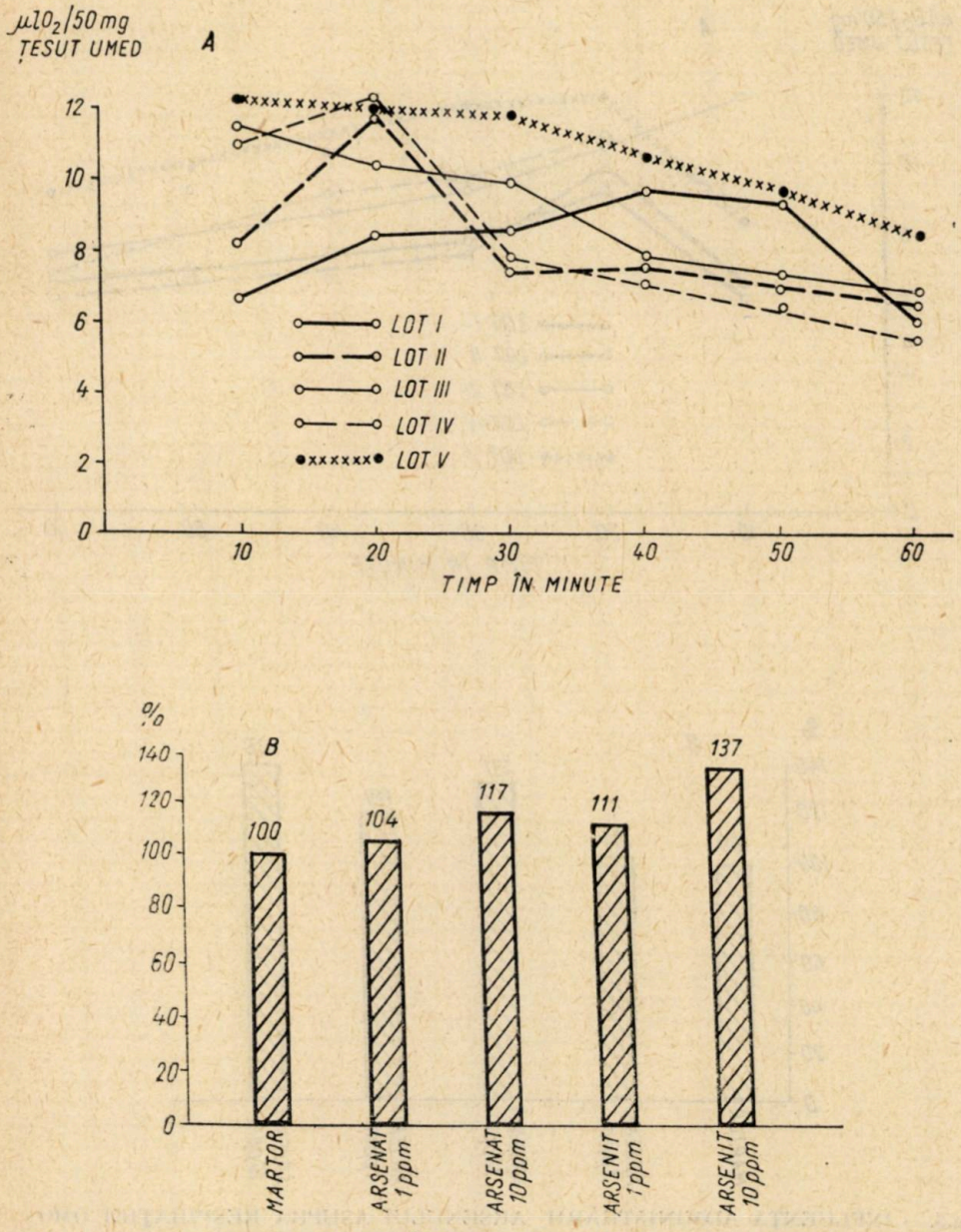


Fig.2. — INFLUENȚA ADMINISTRĂRII ARSENULUI ASUPRA RESPIRAȚIEI OMOGENATULUI HEPATIC ÎN PREZENȚA GLUTAMATULUI.

A: Variația în timp a vitezei respirației. *B*: Consumul total de O_2 în 60 de minute, în % față de martor.

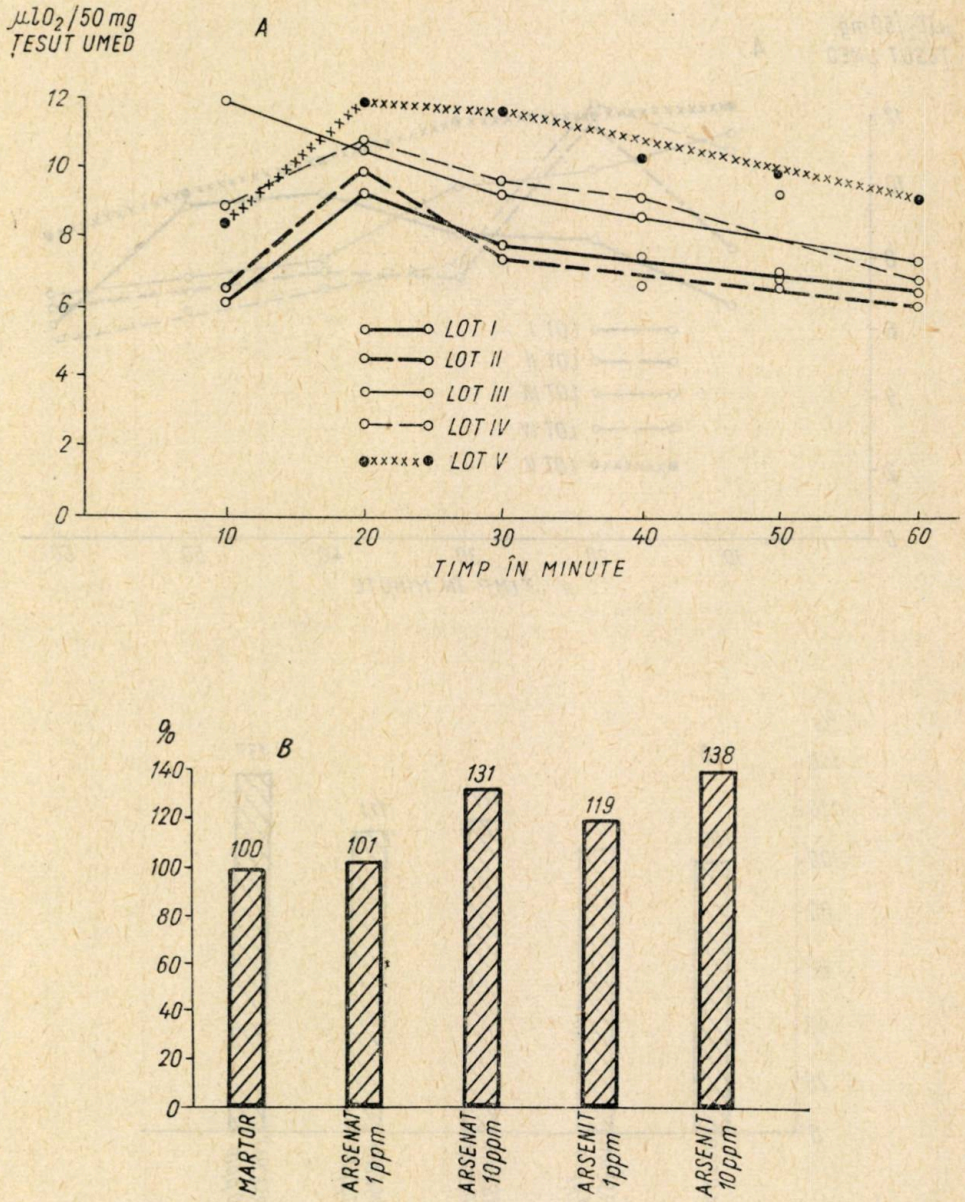


Fig.3. — INFLUENŢA ADMINISTRĂRII ARSENULUI ASUPRA RESPIRAŢIEI OMOGENATULUI HEPATIC ÎN PREZENŢA MALATULUI.

A: Variaţia în timp a vitezei respiraţiei. *B*: Consumul total de O_2 în 60 de minute, în % faţă de martor.

Aceste date, corelate cu rezultatele cercetărilor noastre anterioare [10], permit să se tragă concluzia că arsenitul și arsenatul de sodiu în doza de 10 ppm de arsen exercită efecte toxice. Doza de 1 ppm de arsenit de sodiu, deși a influențat în mai mică măsură respirația omogenatului hepatic, s-a dovedit a nu fi indiferentă pentru organism. Despre aceasta vorbește faptul că, la doza de 1 ppm de arsenit, după 20 de minute se obține un consum de O_2 similar cu cel înregistrat la doza de 10 ppm de arsenit.

Comparativ cu doza de 1 ppm de arsenit, doza de 1 ppm de arsenat exercită un efect mai redus asupra consumului de oxigen, creșterea inițială a respirației fiind mai redusă și mai tardivă.

Prezintă interes faptul că există o *proporționalitate directă între durata administrării arsenului*, respectiv nivelul intoxicației, și *nivelul modificărilor înregistrate*. Astfel, în timp ce după 4 săptămîni de administrare a arsenului sub formă de arsenit de sodiu în doză de 10 ppm nu apar diferențe semnificative ale consumului de oxigen în prezența glutamatului, după 9 săptămîni diferențele devin semnificative. În aceeași ordine de idei se situează și observația că, la lotul care a primit 10 ppm de arsenit, respirația endogenă este, după 4 săptămîni, cu 27% mai crescută decît aceea a lotului martor, iar după 9 săptămîni această diferență ajunge la 42%.

O excepție la această proporționalitate o constituie eficiența proteică, ce se modifică doar în primele 4 săptămîni și devine ulterior similară cu aceea a lotului martor. Această observație și-ar putea găsi o explicație fie în faptul că după 4 săptămîni se încetinește ritmul creșterii, fie că are loc un proces de adaptare.

Efectul arsenitului adăugat *in vitro* asupra respirației endogene și al consumului de O_2, cu glutamat și malat ca substrate, se traduce printr-o inhibiție exercitată de arsenit, în proporție diferită, în funcție de substrat. Aceste observații experimentale sînt concordante cu datele din literatură asupra mecanismului de acțiune al arsenitului ca inhibitor al enzimelor ditiolice implicate în procesele oxidoreducătoare [3].

În cazul succinatului, efectul inhibitor obținut de noi pe omogenat hepatic total este contrar efectului stimulant obținut pe mitocondrii pure de Fluharty și Sanadi [2]. Acest efect contrar al arsenitului pe mitocondrii pure și omogenat hepatic total, la concentrații egale, s-ar putea explica prin faptul că în omogenatul hepatic sînt condiții diferite, care modifică acțiunea arsenitului.

În experiențele cu arsenat adăugat *in vitro* nu s-a constatat o influență asupra utilizării O_2 de către țesutul hepatic, sau numai o foarte ușoară acțiune inhibitorie, nesemnificativă din punct de vedere statistic. Rezultatele noastre sînt concordante cu cele obținute de diferiți autori pe țesuturi și mitocondrii puri [3], [13].

Creșterea respirației endogene și a consumului de O_2, cu glutamat și malat ca substrate, la animalele cărora li s-a administrat arsen *per os* în diferite doze demonstrează modul de acțiune diferit al arsenului *in vivo* față de acțiunea sa *in vitro*. Se cunoaște că arsenul se leagă în orga-

nism de hemoglobină şi de fracţiunea alfa-globulinică a proteinelor plasmatice, precum şi de alte proteine tisulare [2], [4] [11]. Aceasta ar putea explica acţiunea diferită *in vivo* faţă de cea cunoscută *in vitro*.

Animalele care au primit arsen prezintă un consum de O_2 crescut faţă de acela al lotului martor, la o greutate corporală apropiată. Un exemplu îl oferă lotul martor, care la o greutate corporală finală de 199,3 $\pm$ 17,7 g prezintă un consum de O_2 de 3,95 $\pm$ 0,37 microlitri pe g de proteină, în timp ce lotul care a primit 10 ppm de arsenit, la o greutate corporală finală mai mică (188 $\pm$ 15,3 g), are un consum endogen de O_2 pe g de proteină de 5,59 $\pm$ 0,62 microlitri, adică cu 42% mai mare. Acest fapt, precum şi eficienţa mai scăzută a utilizării hranei pentru creştere, ilustrată prin scăderea eficienţei proteice, s-ar putea interpreta ca efectul unui randament scăzut al folosirii resurselor energetice.

Faţă de aceste modificări ale metabolismului energetic se poate aprecia că dozele de arsen admise actualmente în alimentaţie de către majoritatea ţărilor nu sînt indiferente pentru organism.

Institutul de igienă şi protecţia muncii,
Secţia de igiena alimentaţiei

Prezentată la redacţie la 3 decembrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Aldridge W. N., *Liver and brain mitochondria*, Biochem. J., **67**, 433 (1957).
2. Fluharty A. L. ,Sanadi D. R., *On the mechanism of oxidative phosphorylation. II. Effects of arsenite alone and in combination with* 2,3-*dimercaptopropanol*. J. biol. Chem., **236**, 2 772 (1961).
3. Guberniev N. A., Torbocikina L. I., *Specificeskoe deistvie arsenata na nekotorie reakţii obmena vescestv*, Vestnik Akad. Med. Nauk SSSR, **17**, 71 (1962).
4. Hisakazu W., Shigeru M., Kozuo K., Shoji H., *Some biochemical studies on experimental arsening poisoning*, Ann. paediatr. japon, **3**, 724 (1957).
5. Hunter F. E., Ford L., *Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions*, J. biol. Chem., **216**, 357 (1955).
6. Jacobs E. E., Jacob M., Sanadi D. R., *Uncoupling of oxidative phosphorilation by cadmium ion*, J. biol. Chem., **223**, 147 (1956).
7. Minnaert K., *Endogenous respiration of rat liver mitochondria*, Biochem. Biophys. Acta, **44**, 595 (1960).
8. Nobutomo I., Cohn M., *The transfer of o form arsenate* O^{18} *to phosphate arsenate stimulated adenosine triphosphatase reactions*, J. biol. Chem., **238**, 4026 (1963).
9. Sanadi D. R., Langley M., White F., *Alpha-ketoglutaric dehidrogenase. VII. The role of thyoctic acid*, J. biol. Chem., **234**, 183 (1959).
10. Sporn A., Dinu I., *Enzymatic studies in experimental arsenical poisoning*, Rev. roum. Biochim., **1**, 209 (1964).
11. Stenberg A. I., *Sovremennie dannie o estestvennom soderjanii mişiaka v rastitelnih i jivotnih tkaniah i deistvie „tkanievogo" mişiaka na jivotnii organizm*, Naucinie trudi Instituta Pitania AMN SSSR, M. Izd. AMN SSSR, **3**, 15 (1948).
12. Wadkins Ch. L., Hopkins J., *Stimulation of ATP hydrolisis by arsenate in phosphorylating particles*, Federat. Proc., **19**, 39 (1960).
13. Voinar A. O., *Biologhiceskaia rol mikroelementov v organizme jivotnih i celoveka*, Sovetskaia Nauka Moskva, 1953, 323—335.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 2, 235–246 (1965)

STUDIU CITOCHIMIC ŞI CITOSPECTROFOTOMETRIC PE LEUCOCITELE ŞOBOLANILOR IRADIAŢI INTERN CU ^{32}P.

III. UTILIZAREA UNUI COMPLEX VITAMINIC CA RADIOPROTECTOR *

GR. TURCU, V. VASILESCU, A. CIUREŞ şi A. ST. ALBU

616.155.3–092.9

Rezumat. — S-au determinat modificări morfologice, enzimatice şi nucleare pe leucocitele şobolanilor iradiaţi intern cu ^{32}P, cărora li s-a administrat în dietă un complex vitaminic hidrosolubil. Rezultatele obţinute arată că vitaminele influenţează activitatea enzimatică a granulocitelor care apar în circulaţie în timpul iradierii; de asemenea ele influenţează calitatea materialului nuclear limfocitar, în sensul atenuării efectelor produse de radiaţii.

Am arătat, în lucrări anterioare [1–2], care sînt modificările citochimice şi citospectrofotometrice ale leucocitelor provenite de la şobolanii iradiaţi intern cu ^{32}P, cărora li s-a administrat în cursul experienţei o dietă simplă sau o dietă îmbogăţită cu acid ascorbic. Am conchis [2] că acidul ascorbic administrat în dietă cu scopul de a suplini scăderea acestuia în decursul iradierii în principalele organe radiosensibile nu poate — prin cunoscutul efect de autoprotecţie — să realizeze o ameliorare importantă, nici a numărului de leucocite, nici a modificărilor citochimice şi citospectrofotometrice, deşi vitamina C joacă un rol important în stimularea sintezei acizilor nucleici *in vitro* şi *in vivo* [3], ca şi în procesele de oxidoreducere celulară.

Ţinînd seama de faptul că o serie de autori [4, 5] comunică, în cazul iradierii externe, rezultate mai bune ca urmare a utilizării unui complex vitaminic, ne-am propus în lucrarea de faţă să determinăm o serie de parametri morfologici, citochimici şi citospectrofotometrici pe leucocitele şobolanilor iradiaţi intern cu ^{32}P, cărora li s-a administrat pe tot timpul experienţei o dietă îmbogăţită cu vitamine hidrosolubile.

MATERIAL ŞI METODE

Am efectuat lucrarea pe şobolani tineri (6–8 luni), masculi, de rasă Wistar. Am început lucrarea pe 40 de şobolani, din care am selecţionat 20, în urma unor determinări repetate ale numărului de leucocite. Aceştia prezentau valori foarte apropiate (CV 10–15%).

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 2 (1965), în limba franceză.

Am determinat la aceştia, în ziua 0, următorii parametri :

1) Numărul de leucocite.

2) Formula leucocitară.

3) Procentul de granulocite în funcţie de nivelul fosfatazei alcaline leucocitare (FAL). Am utilizat pentru determinarea acestui procent metoda citochimică a lui Gömöri, modificată de Leonard, Izraels, Wilkinson (citaţi după [6]) : metoda ne-a permis diferenţierea granulocitelor în trei categorii, după nivelul activităţii fosfatazice : a) granulocite de gradul 0, fără activitate fosfatazică ; b) granulocite de gradul I, cu activitate fosfatazică medie ; c) granulocite de gradul II, cu activitate fosfatazică maximă.

4) Curbele citospectrofotometrice ale nucleului limfocitar. Curbele au fost trasate cu ajutorul unui citospectrofotometru invizibil, construit în laboratorul catedrei [7].

Am împărţit apoi animalele în patru loturi : A, B, C şi D. Şobolanii din loturile A şi C au fost injectaţi intraperitoneal cu 1 μC/g soluţie izotonică de $^{32}PO_4HNa_2$, iar loturile B şi C cu cîte 2 μC/g. Loturile A şi B au primit în timpul experienţei o dietă standard fiziologică, iar loturilor C şi D li s-a adăugat în dieta zilnică următorul complex vitaminic [4] : rutin (P) 10 mg ; acid ascorbic (C) 10 mg ; tiamină (B_1) 1 mg ; riboflavină (B_2) 2 mg ; acid nicotinic (PP) 10 mg şi piridoxină (B_6) 0,2 mg. Am determinat apoi la toate animalele parametrii arătaţi mai sus, în zilele 1, 3, 6, 9, 12, 15 şi 20 după injectarea izotopului. Ultima zi corespundea cu durata medie efectivă de iradiere a ^{32}P. Animalele au fost ţinute în cuşti individuale, pentru colectarea urinii radioactive. Recoltarea probelor s-a făcut întotdeauna la ora 8 dimineaţa.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prezentarea şi discutarea rezultatelor experimentale trebuie să ţină seama de particularităţile iradierii interne, urmărind, totodată, deosebirea de răspuns între loturile care au primit în dietă complex vitaminic şi cele care nu au primit.

În figura 1 am reprezentat, într-un sistem de axe, dinamica scăderii şi refacerii leucocitare la toate cele patru loturi. Pentru a putea face comparaţie, am luat în ordonată procentul de leucocite faţă de ziua 0 (în ziua 0 numărul de leucocite = 100%). Urmărind variaţia procentului de-a lungul celor 20 de zile, se poate constata că la loturile A şi B, care se deosebesc între ele numai prin doza administrată, scăderea numărului de leucocite este foarte diferită, fiind mult mai accentuată la lotul B ; în ambele cazuri, maximul de scădere se întîlneşte în ziua a 12-a, însă refacerea din ziua a 20-a de iradiere este mult mai mare la lotul A (83%) decît la lotul B (51%).

La loturile A şi C, care se deosebesc între ele numai prin dietă (lotul C a primit vitamine), variaţia numărului de leucocite diferă, însă mărimea variaţiei (cu excepţia primei zile) este prea puţin evidentă pentru a putea trage o concluzie asupra eventualului rol radioprotector al complexului vitaminic. Aceeaşi situaţie se observă şi în cazul loturilor B şi D.

În figurile 2 şi 3 am reprezentat separat dinamica scăderii şi refacerii procentului de limfocite şi de granulocite. Am făcut acest lucru deoarece am ţinut seama, pe de o parte, de variaţia distribuţiei în timp a ^{32}P în interiorul organismului după injectare, iar pe de altă parte de radiosensibilitatea diferită a celor două tipuri leucocitare. Din figura 2

rezultă că limfocitele loturilor A și B scad încă din prima zi, scădere ce diferă între loturi din cauza dozei. În cazul limfocitelor loturilor C și D, graficul ne arată că în prima zi acestea au o creștere ușoară, iar diferențele dintre loturi de-a lungul celor 20 de zile sînt mici (deși dozele între loturi variază de la simplu la dublu). Este de remarcat, în special, variația

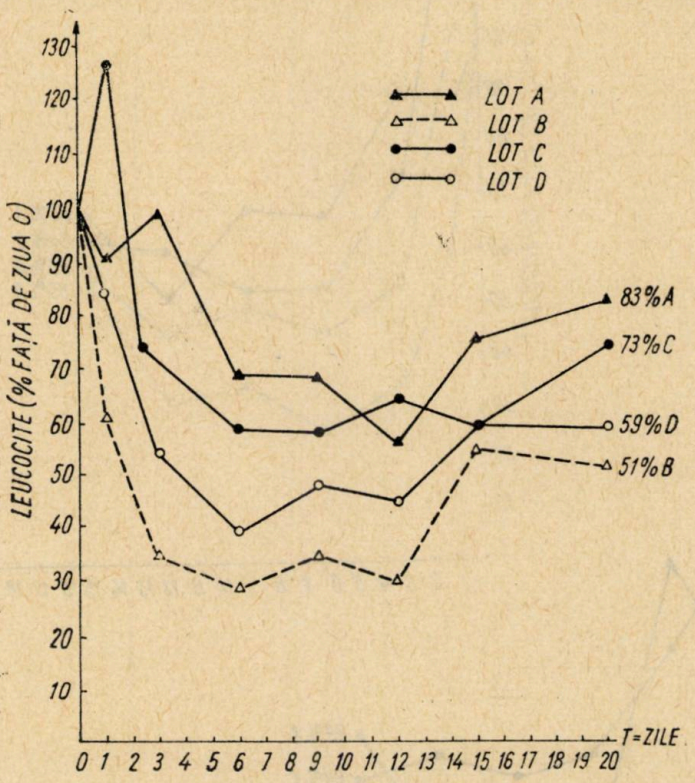
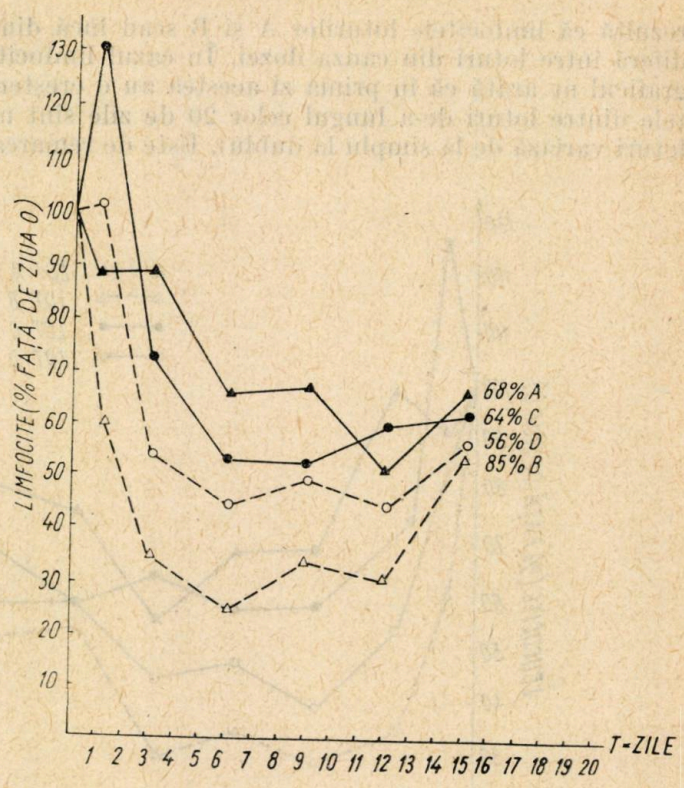


Fig. 1. — Variația leucocitelor în decursul iradierii interne cu ^{32}P.

numărului de limfocite ale lotului D, care totdeauna se menține crescut față de lotul B, lot care a primit aceeași doză de iradiere ca și D, dar n-a primit în hrană complex vitaminic. Figura 3 reprezintă variația procentului de neutrofile în decursul iradierii. În cazul loturilor A și C (1 μC/g), în primele 3 zile izotopul se găsește concentrat în schelet în cantitate foarte mică, ceea ce face ca numărul de neutrofile să crească, deoarece cantitatea mică de radioizotopi stimulează mielopoieza. Începînd cu ziua a 6-a, zi în care ^{32}P prezintă maximul de acumulare în oase, scăderea numărului de neutrofile este evidentă. Nu se pot face aprecieri asupra rolului vitaminelor în cazul lotului C, deoarece variațiile numărului de neutrofile față de lotul A sînt mici. În cazul loturilor B și D (2 μC/g) neutrofilele scad chiar din prima zi, deoarece, datorită cantității mai mari de ^{32}P injectat, acesta se acumulează în schelet într-o cantitate

Fig. 2. — Variația limfocitelor în decursul iradierii interne cu ^{32}P.



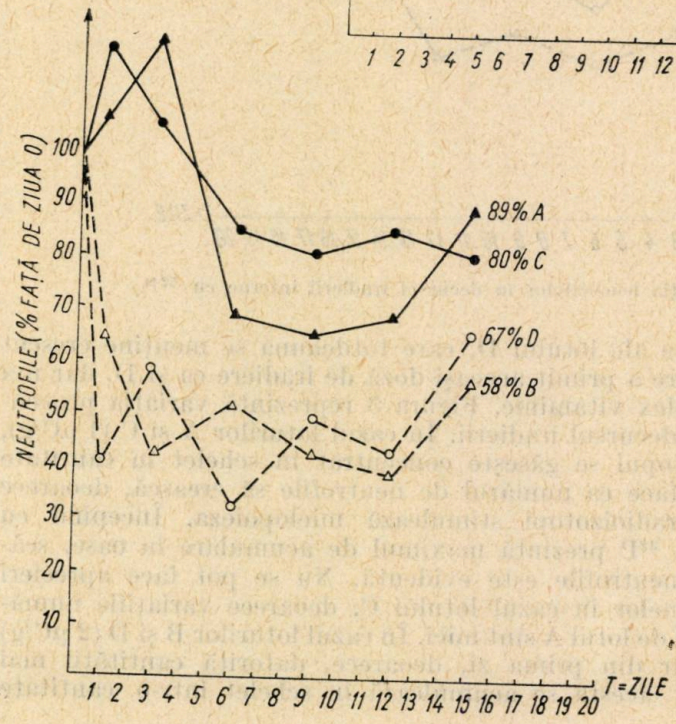


Fig. 3. — Variația neutrofilelor în decursul iradierii cu ^{32}P.

importantă încă din prima zi, ceea ce are drept efect inhibarea timpurie a granulopoiezei. Și în cazul lotului D variația numărului de granulocite în raport cu aceea a lotului B este neînsemnată.

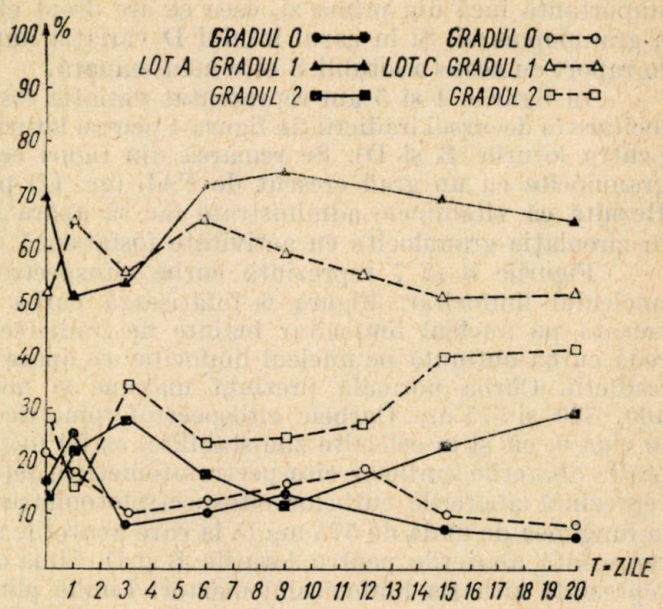
În figurile 4 și 5 am reprezentat variația fosfatazei alcaline granulocitare în decursul iradierii (în figura 4 pentru loturile A și C, iar în figura 5 pentru loturile B și D). Se remarcă din figuri creșterea procentului de granulocite cu un grad crescut de FAL (gr. II) pentru loturile C și D. Rezultă că vitaminele administrate fac să apară sau să supraviețuiască în circulație granulocite cu activitate fosfatazică maximă.

Figurile 6 și 7 reprezintă curbe citospectrofotometrice tipice ale nucleului limfocitar. Figura 6 înfățișează curba citospectrofotometrică trasată pe nucleul limfocitar înainte de iradierea internă, iar figura 7 redă curba obținută pe nucleul limfocitar ce apare în circulație în timpul iradierii. Curba normală prezintă maxime și minime de absorbție la 460, 530 și 575 mμ. Curbele citospectrofotometrice au fost trasate atît în ziua 0, cît și în celelalte zile stabilite, astfel încît am putut reprezenta grafic abaterile curbelor citospectrofotometrice față de ziua 0. Figura 8 reprezintă abaterile curbelor citospectrofotometrice ale loturilor A și C la lungimea de undă de 575 mμ (λ la care abaterile sînt maxime). Figura 9 reprezintă abaterile pentru loturile B și D. Linia orizontală (martor — 0) reprezintă situația limfocitului martor. Liniile pline ne dau abaterile pe verticală, iar liniile punctate abaterile pe orizontală. Abaterile pe verticală trădează modificări de ordin cantitativ datorate fixării diferite de colorant Giemsa în nucleul limfocitar, în timp ce abaterile pe orizontală reprezintă schimbări calitative din nucleu (schimbări însoțite de schimbarea lungimii de undă la care absorbția este maximă). Se constată că, în timp ce abaterile pe verticală sînt foarte însemnate pentru toate loturile, abaterile pe orizontală sînt aproape zero în cadrul loturilor C și D (loturi care au primit în hrană vitamine). Aceasta înseamnă că, în cazul loturilor cu dietă îmbogățită cu complex vitaminic, calitatea nucleului limfocitar este foarte apropiată de aceea a limfocitului normal.

Scopul lucrărilor noastre este de a stabili teste biofizice și biochimice sensibile în iradierea internă, precum și de a găsi substanțe care, administrate în organism o dată cu sursa de iradiere, să ofere acestuia o oarecare protecție. Majoritatea lucrărilor de pînă acum [8] [9] [10], care au folosit surse interne de iradiere, au utilizat drept indici pentru urmărirea efectelor radiației observații clinice obișnuite, ca: modificările cantitative ale tabloului sanguin, supraviețuirea, curba ponderală etc. Nu am găsit în literatură indicații privind radioprotecția în iradierea internă, deși astfel de radioprotectori sînt foarte necesari, dată fiind amploarea investigațiilor clinice cu radioizotopi.

Din lucrarea noastră rezultă că determinarea cantitativă a leucocitelor în timpul iradierii este un test foarte important, dar el nu ne poate spune nimic asupra calității leucocitelor care continuă să existe sau să apară în circulație în timpul iradierii. Studiile enzimatice citochimice și citospectrofotometrice ne pot da astfel de informații. Am urmărit fosfataza alcalină leucocitară nu pentru că ar fi o enzimă mai radiosensibilă, ci pentru că ea poate fi ușor determinată la bolnavii investigați

Fig. 4.— Variaţia procentului de granulocite cu un anumit grad de FAL (loturile A şi C).



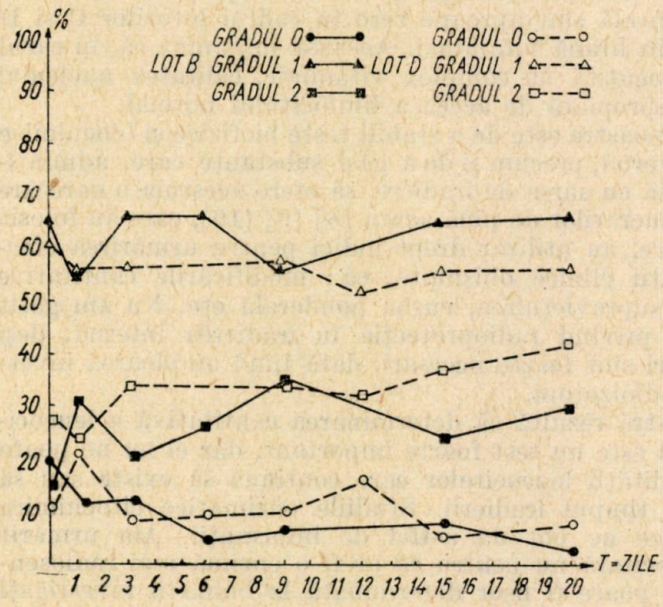


Fig. 5.— Variaţia procentului de granulocite cu un anumit grad de FAL (loturile B şi D).

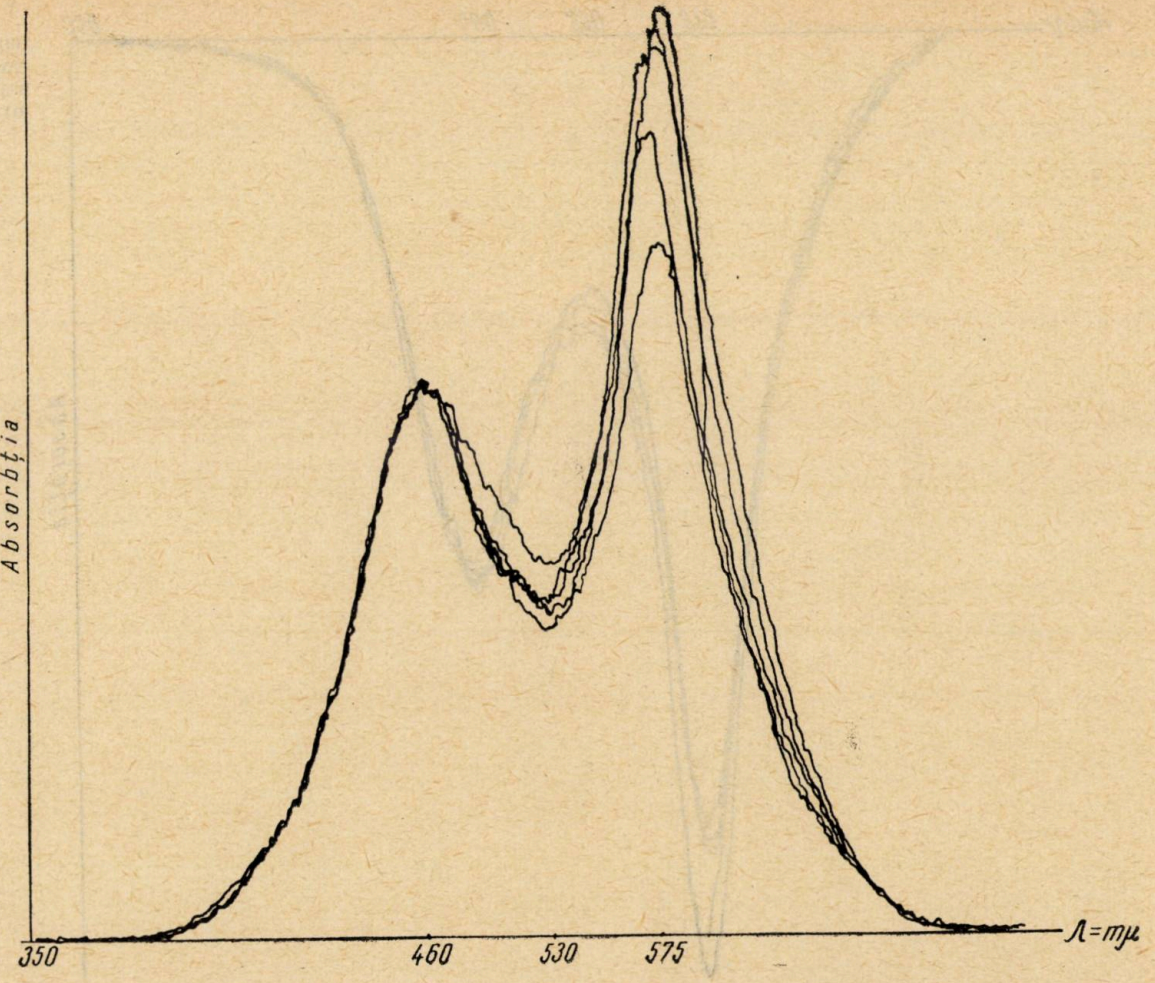


Fig. 6. — Curbă citospectrofotometrică tipică pentru nucleul limfocitelor provenite de la șobolanii martori (înainte de iradiere).

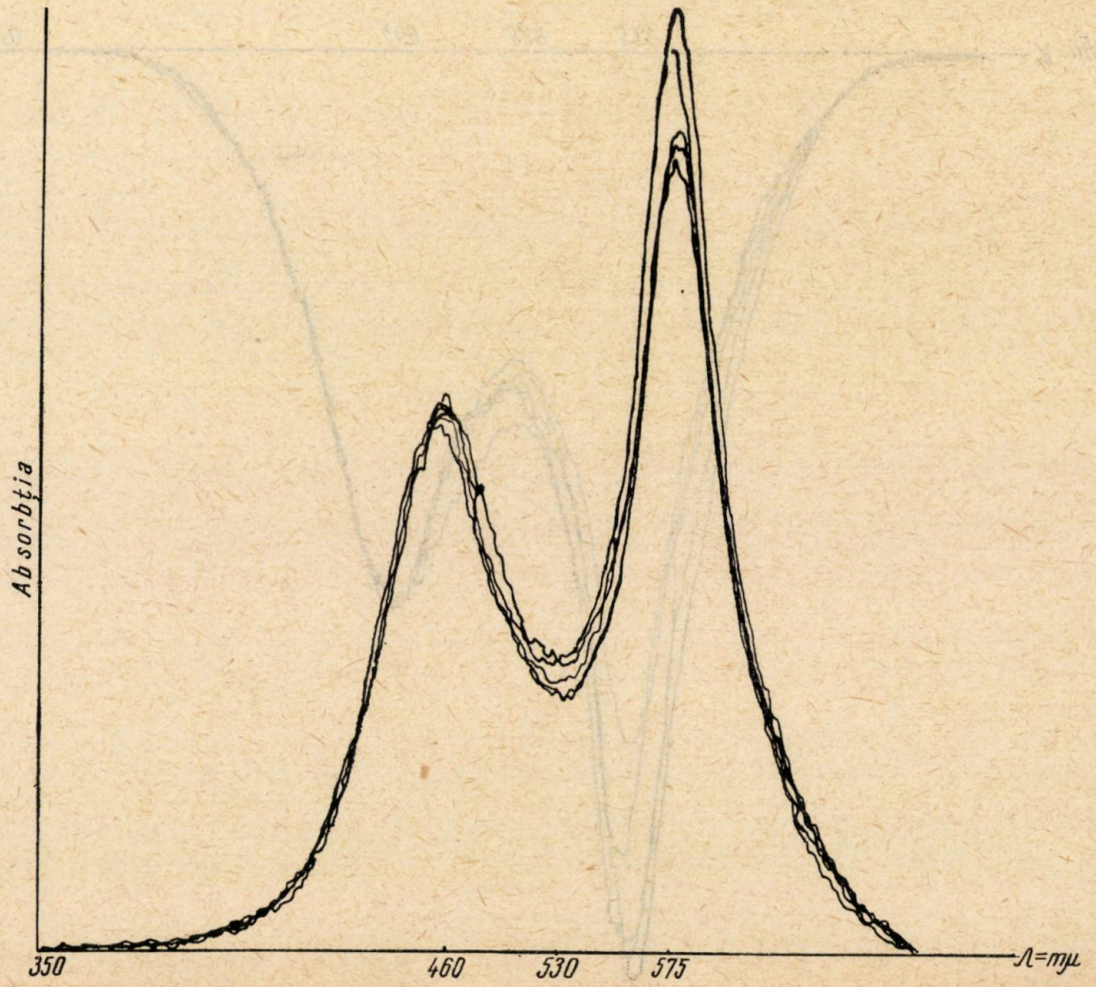


Fig.7. — Curbă citospectrofotometrică tipică pentru nucleul limfocitelor provenite de la șobolanul iradiat intern cu ^{32}P.

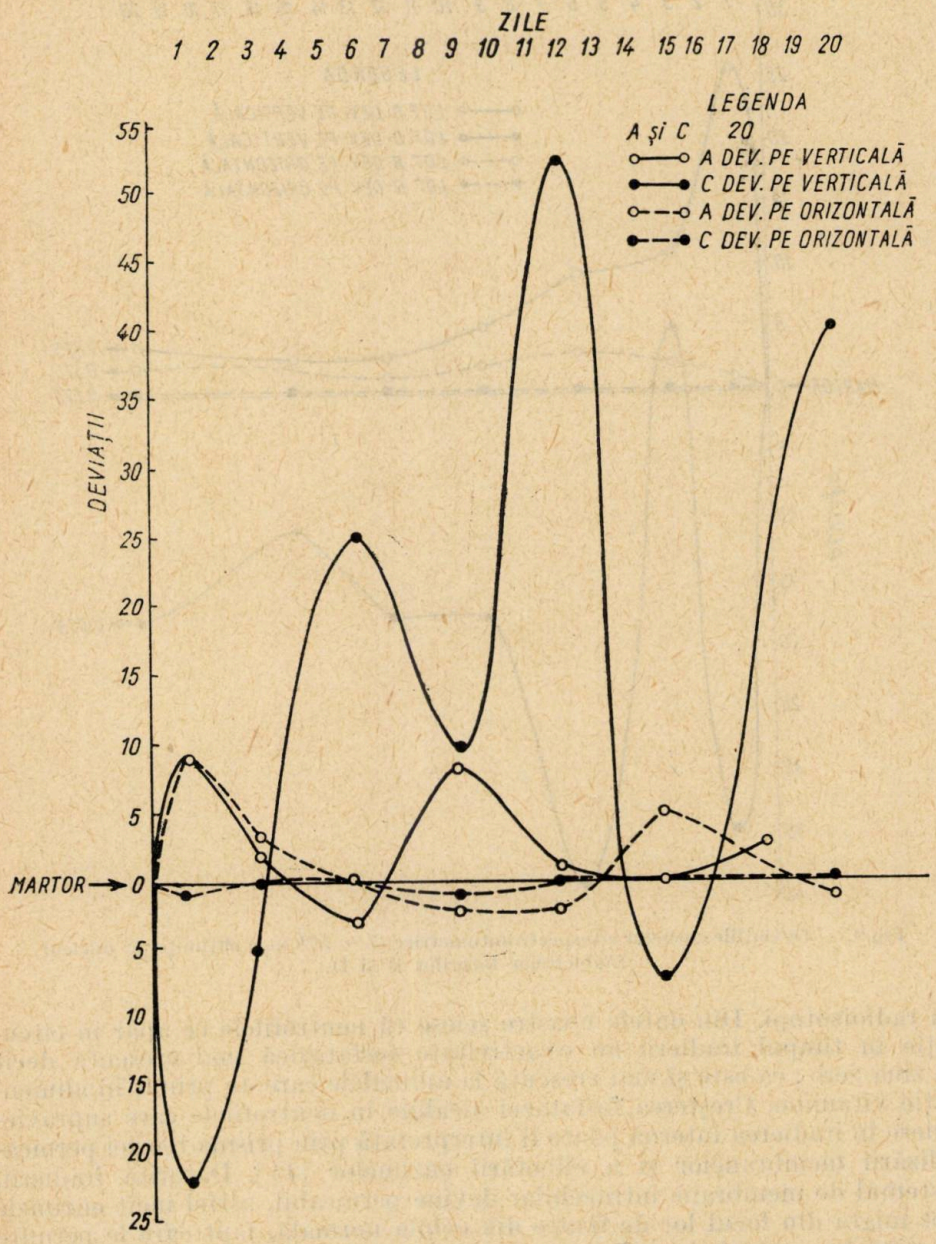


Fig. 8.— Deviaţiile curbelor citospectrofotometrice ($\lambda = 575$ mμ) obţinute pe nucleul limfocitelor loturilor A şi C.

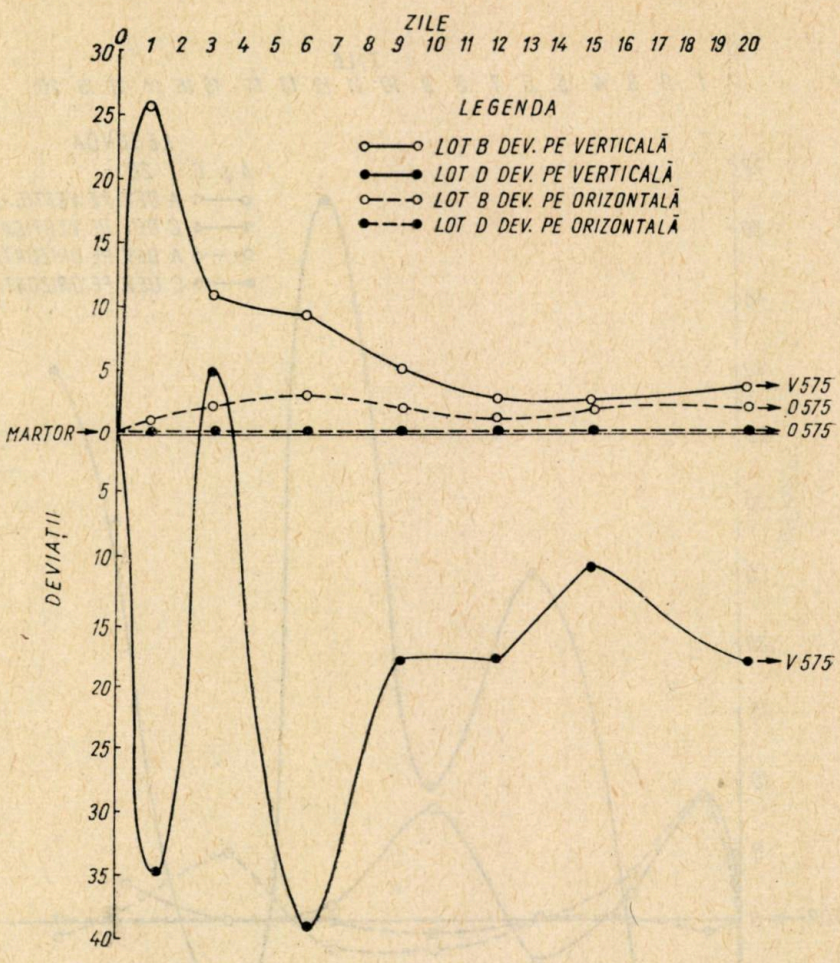


Fig.9. — Deviaţiile curbelor citospectrofotometrice (λ = 575 mμ) obţinute pe nucleul limfocitelor loturilor B şi D.

cu radioizotopi. Din datele noastre reiese că neutrofilele ce apar în circulaţie în timpul iradierii au o activitate fosfatazică mai crescută decît în ziua zero ; ea este şi mai crescută la animalele care au primit în alimentaţie vitamine. Creşterea fosfatazei alcaline în neutrofilele care supravieţuiesc în iradierea internă poate fi interpretată prin prisma teoriei permeabilizării membranelor şi a eliberării enzimelor [11]. Datorită iradierii, sistemul de membrane intracelular devine permeabil, astfel încît enzimele pot migra din locul lor de fixare din celula normală, fapt care le permite să vină în contact cu substrate de care anterior erau izolate. Venind în contact cu substrate specifice, activitatea lor apare crescută. Intervenţia complexului vitaminic în potenţarea activităţii enzimatice, nu se poate explica decît prin aceea că majoritatea vitaminelor administrate de noi

au în organism rol de coenzime. Or, cum coenzimele sînt sensibile la radiații, ele pot fi înlocuite cu cele ajunse în organism prin aportul alimentar. Aceasta constituie o explicație, fiindcă, de fapt, activitatea unei enzime în timpul iradierii poate fi influențată de foarte mulți parametri [12], dintre care citām : a) starea suprafețelor de separație a structurilor interne ale celulei care influențează gradul de adsorbție a enzimei, deci posibilitatea de contact între enzimă și substrat ; b) reacția mediului în zona de localizare a enzimei ; c) prezența de activatori și inhibitori ; d) modificarea organizării submicroscopice a organitelor ; e) degradarea și biosinteza enzimelor respective.

Oricare dintre factorii citați pot interveni în modificarea activității enzimatice în timpul iradierii, ceea ce duce la o „discoordonare enzimatică".

Curbele citospectrofotometrice ale nucleului limfocitar prezintă abateri în special pe verticală ; pe orizontală (schimbări calitative) deviațiile sînt mici pentru loturile A și B (fără vitamine), iar pentru loturile C și D (cu vitamine) sînt foarte apropiate (lotul C) sau chiar coincid cu normalul (lotul D). Aceste deviații ne apar ca deosebit de interesante dacă ținem seama că, în timpul iradierii, prin schimbarea permeabilității membranelor, ionii de calciu și de magneziu pot pătrunde ușor în nucleu, pot lega grupările acide libere, ceea ce duce la un fel de coagulare a nucleoproteinelor [11]. Schimbarea fizico-chimică a componenților nucleari explică de ce nucleul de limfocit ce apare în circulație în timpul iradierii fixează colorantul Giemsa într-o cantitate diferită de nucleul limfocitului normal (abaterile mari de pe verticală). Cît privește deviația curbelor citospectrofotometrice pe orizontală, aceasta se poate explica dacă ținem seama că, în timpul iradierii, dezoxiribonucleaza (ADN-aza), eliberată din mitocondrii, pătrunde în nucleul limfocitar și duce — în funcție de cantitate și activitate — fie la o citoliză, fie la o depolimerizare a acidului dezoxiribonucleic, ceea ce are drept consecință o schimbare calitativă a acestuia. Este interesant faptul că limfocitele care apar în circulație în timpul iradierii sînt din acest punct de vedere foarte apropiate de limfocitul normal numai în cazul în care acestea au provenit de la animale care au primit în alimentație complex vitaminic. Aceasta ne îndreptățește să afirmăm că vitaminele au în iradierea internă influență asupra calității limfocitelor.

Menționăm, în încheiere, că deosebirile găsite nu s-ar putea datora unei doze diferite la animalele care au primit complex vitaminic față de cele care n-au primit, deoarece cantitatea de izotopi injectată a fost identică, iar activitatea urinii, determinată zilnic, nu a arătat o accelerare a eliminării izotopului datorită aportului vitaminic.

CONCLUZII

Administrarea la șobolani a unui complex vitaminic pe tot timpul iradierii interne cu ^{32}P arată că :

a) vitaminele nu influențează numărul de leucocite care apar în circulație ;

b) vitaminele influenţează calitatea granulocitelor şi limfocitelor, în sensul că granulocitele au o activitate fosfatazică crescută; calitatea materialului nuclear limfocitar este apropiată de aceea a nucleului limfocitului normal.

Catedra de biofizică, I.M.F., Bucureşti

Prezentată la redacţie la 1 decembrie 1964

BIBLIOGRAFIE

1. Gr. Turcu, C. Dimoftache, P. Wexler, V. Vasilescu, *Étude cytochimique et cytospectrophotométrique sur les leucocytes des rats soumis à une irradiation interne avec du* ^{32}P, Rev. roum. Biochim., **1**, 103 (1964).
2. Gr. Turcu, V. Vasilescu, C. Dimoftache, P. Wexler, *Étude cytochimique et cytospectrophotométrique sur les leucocytes des rats soumis à une irradiation interne avec du* ^{32}P. *II. Utilisation de l'acide ascorbique comme radioprotecteur*, Rev. roum. Biochim., **1**, 343 (1964).
3. B. I. Goldstein, V. V. Gherasimova, L. G. Kondratieva, *Vlianie vitamina C na izmenenia nucleinovih chislot v jivih tkaniah*, Biohimiia, **19**, 531 (1954).
4. S. P. Perelepkin, G. I. Bondarev, *Zaşcitnaia roli pişci pri ostrih pobrejdenia poiavliaiuşcihsea pod deistviem zlucenii*, Mediţin. radiol., **4**, 53 (1959).
5. M. F. Nesterin, *Vlianie vitaminov na evoliuţiiu podvrejdenii poiavivşcihsea pod deistviem ioniziruiuşcevo izlucenia*, Mediţin. radiol. **6**, 83 (1961).
6. C. T. Nicolau, S. Nicoară, *Valoarea indicelui fosfatazei alcaline leucocitare în stare normală şi patologică*, Med. int., **14**, 1173(1962).
7. A. Ciureş, V. Vasilescu, Maria Constantinov, *Un dispozitiv de citospectrofotometrie şi unele rezultate obţinute cu ajutorul acestei metode*, Fiziol. norm. şi patol., **7**, 543, 1962.
8. Th. F. Dougherty, *Some aspects of internal irradiation. Proceedings of a symposium held at the Homestead*, Heber, Utah 8—11 mai 1961, Pergamon Press, 1962.
9. E. Spode, *Auf das Menschweinchen nach der Verabfolgung von hohen Radionuklid Dosen ausgeführte Haematologische Untersuchungen. Die Wirkung auf das peripherische Blutbild von* ^{95}Sr, ^{106}Cu, ^{32}P, Strahlentherapie, **119**, 47 (1962). *Auf das Menschweinchen nach der Veragfolgung von hohen Radionuklid Dosen ausgeführte Haematologische Untersuchungen. Veränderungen in dem peripheralen Blutbild nach der Verabfolgung von* ^{90}Sr, ^{140}Ba, ^{137}Cs. Strahlentherapie, **117**, 356 (1962).
10. V. A. Sondak, *Povrejdenia poiavleaiuşciesea pri malih dozah izlucenia* ^{32}P, Biofizika, **1**, 211 (1956).
11. P. Alexander, Z. M. Bacq, *The initial effects of the ionizing radiations on cells*, Proceedings of the Symp. held in Moscow, oct. 1960. Edited by R. J. C. Harris, Academic Press 1961.
12. A. M. Kuzin, *Radiaţionnaia biohimia*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moscova, 1962.

Immuno-electrophoretic analysis. Application to human biological fluids, editată de P. Grabar şi P. Burtin, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam — Londra — New York, 1964, IX + 302 p., cu 99 fig. şi 21 de tabele

Apărută în 1960, cartea *Analyse immuno-électrophorétique* a cunoscut în scurt timp o largă răspîndire, fiind tradusă în 1963 într-o ediţie prescurtată în limba rusă şi, recent, într-o ediţie revăzută şi completată în limba engleză.

În ediţia engleză autorii au încercat să aducă la zi conţinutul monografiei, completînd în acelaşi timp omisiunile bibliografice ale ediţiei franceze. Examinînd informaţia bibliografică a ediţiei engleze, se constată că, în majoritatea capitolelor, literatura citată este apărută pînă în 1962 inclusiv, şi numai sporadic sînt incluse lucrări apărute în 1963, de obicei cele ale autorilor care au întocmit capitolul respectiv. Sub acest aspect, ediţia engleză este în mai mică măsură adusă la zi decît cea franceză care, apărută în 1960, conţinea bibliografia pînă în 15 decembrie 1959 şi chiar unele articole apărute în anul editării cărţii.

Structura cărţii s-a păstrat neschimbată, cele 27 de capitole fiind împărţite în trei părţi principale :

1. Metodele experimentale
2. Aplicarea analizei imunoelectroforetice la studiul plasmei umane
3. Studiul imunoelectroforetic al altor lichide biologice umane

Faţă de ediţia franceză, cartea posedă un singur capitol în plus, consacrat cercetărilor imunoelectroforetice asupra lichidului amniotic şi meconiului, redactat de G. von Muralt şi D. L. A. Roulet.

Prima parte a monografiei este alcătuită din 4 capitole în care sînt descrise metodele imunoelectroforetice de analiză (P. Grabar), reacţiile de caracterizare a constituenţilor proteici şi interpretarea cantitativă a rezultatelor (J. Uriel), precum şi modul de preparare a antiserurilor şi utilizarea lor în analiza imunoelectroforetică (P. Burtin).

În a doua parte a cărţii sînt cuprinse rezultatele obţinute în urma aplicării metodei imunoelectroforetice la studiul plasmei umane normale şi patologice. În această parte a cărţii, cea mai întinsă, împărţită în 14 capitole, o atenţie deosebită s-a acordat analizei proteinelor din serul uman normal, redactată de unul dintre autori (P. Burtin). Studiul serurilor patologice a fost împărţit în mai multe capitole, fiind descrise detaliat modificările imunoelectroforetice care intervin în diferite afecţiuni, ca : agammaglobulinemie, macroglobulinemie, boli hepatice, reumatism, lupus eritematos, boli de sînge etc. Aceste capitole au fost întocmite de acei autori francezi, elveţieni, germani şi americani care au contribuit substanţial, prin lucrări originale, la îmbogăţirea cunoştinţelor actuale în domeniile respective.

Tot în partea a II-a a cărţii este prezentată şi problema controlului imunoelectroforetic al fracţionării plasmei umane, capitol de mare interes pentru cei care studiază, sub aspect imunochimic, diferitele proteine plasmatice.

În partea a treia a cărţii sînt trecute în revistă aplicaţiile analizei imunoelectroforetice la alte lichide biologice decît sîngele. O pondere însemnată o are capitolul „Studii imunoelectroforetice asupra proteinuriilor", redactat de Ch. de Vaux St. Cyr şi J.C. Patte. În cele 9 capitole

ale ultimei părți sînt prezentate cercetările imunoelectroforetice efectuate asupra proteinelor din lichidul cefalorahidian, lichidul sinovial și perilimfatic, lichidul seminal, amniotic și meconiul, precum și din elementele figurate ale sîngelui.

Față de ediția franceză, s-a mărit capitolul dedicat studiului imunoelectroforetic al proteinelor din lapte și colostru. Autorii acestui capitol — G. von Muralt, E. Gugler și D. L. A. Roulet (Elveția) — au remediat deficiențele bibliografice din prima ediție, făcînd o expunere exhaustivă a problemei, pe baza literaturii apărute pînă în 1962. Astfel cele 9 indicații bibliografice date la ediția franceză au crescut la 56, dintre care 45 sînt publicate înaintea anului 1960.

În părțile consacrate aplicațiilor, autorii au încercat ca, în cîteva capitole introductive și concluzive, să sistematizeze materialele prezentate și să concentreze rezultatele obținute. Astfel, în partea a II-a, P. Burtin a făcut o succintă și reușită sinteză a cercetărilor imunoelectroforetice consacrate serurilor patologice (capitolele 8 și 18), iar în partea a III-a același autor a făcut o sistematizare a cercetărilor, clasificînd lichidele biologice în două grupe principale : prima include acele medii biologice care conțin aceeași cantitate și proporție de proteine plasmatice ca și plasma, cea de-a doua cuprinde mediile ce conțin proteine specifice alături de proteine serice prezente într-o cantitate mai mică și în proporție diferită.

* * *

În capitolul consacrat metodei de analiză, P. Grabar descrie detaliat tehnica de lucru elaborată împreună cu C. A. Williams în 1953 și perfecționată ulterior cu alți colaboratori ai săi. Acest mod de tratare a problemei ușurează considerabil munca cercetătorului dornic să-și însușească rapid o tehnică de lucru eficientă. Deoarece celelalte metode de imunoelectroforeză, ca : microtehnicile, tehnicile bi- și tridimensionale, radioimunoelectroforeza, tehnicile în gel de amidon și pe hîrtie de acetat de celuloză etc., sînt numai amintite sau descrise sumar, cititorul interesat să aleagă una dintre aceste tehnici este obligat să consulte literatura de specialitate.

Interpretarea rezultatelor este, poate, operația cea mai dificilă a analizei imunoelectroforetice. Dacă determinarea numărului constituenților nu este decît rareori dificilă, în schimb identificarea constituenților rămîne o operație a cărei reușită este dependentă de aplicarea corectă a metodelor de identificare. Din păcate, în carte nu sînt descrise decît cîteva dintre procedeele care se utilizează în prezent în analiza imunochimică. În mod surprinzător, a fost omisă descrierea metodelor de identificare care se realizează prin întreruperea șanțului care conține anticorpii, prin folosirea unui orificiu suplimentar umplut cu antigen sau prin scurtarea șanțului, procedee utilizate cu succes de numeroși cercetători în experiențele lor (vezi, de exemplu, J. Heremans, *Les globulines sériques du système gamma*, Arscia, Brussels, 1961).

În cursul efectuării reacțiilor încrucișate prin tehnica imunoelectroforetică, pot apărea „pintenii" care semnalează reacțiile de identitate parțială. Ar fi fost de folos ca în carte să se rezerve un anumit spațiu și acestei probleme, mai ales că la stabilirea raporturilor dintre diferiții determinanți antigenici ai unei proteine și multiplicitatea liniilor de precipitare trebuie să se țină seama de multe ori de reacțiile de identitate parțială.

Metodele de identificare imunochimică a constituenților evidențiați imunoelectroforetic sînt completate prin colorarea liniilor de precipitare și prin efectuarea unor reacții enzimatice specifice. Scris de J. Uriel, capitolul consacrat acestei probleme conține o descriere minuțioasă și foarte bine informată a principalelor metode care evidențiază substanțele legate de proteine, ca lipidele, glucidele, acizii nucleici, substanțele minerale etc. Dintre reacțiile enzimatice care pot fi aplicate în mediu gelificat, sînt prezentate reacțiile de caracterizare a ceruloplasminei (oxidarea p-fenilendiaminei), peroxidazelor, catalazelor, esterazelor cu diferite specificități, enzimelor proteolitice și ribonucleazelor. Posibilitatea efectuării acestor reacții de caracterizare

mărește eficiența analizei imunoelectroforetice, antigenele fiind astfel caracterizate prin trei parametri: mobilitate electroforetică, specificitate imunochimică și activitate enzimatică (sau compoziție chimică caracteristică, în raport cu natura substanțelor cu care sînt complexate proteinele).

Proteinele din plasma umană normală au fost intens investigate imediat după elaborarea metodei, astfel că în ultimul deceniu s-a adunat o bogată literatură. Capitolul consacrat acestei probleme are meritul de a fi selecționat și ordonat materialul bibliografic, prezentîndu-l într-o formă care permite utilizarea lui nemijlocită în practica analizei imunoelectroforetice a plasmei sau a serului. Sînt prezentate și analizate liniile de precipitare care se formează în zonele prealbuminei (ρ), albuminei, globulinelor α_0, α_1, α_2, β_1, β_2 și γ, fibrinogenului și lipoproteinelor. Astfel, cele peste 100 de lucrări publicate în acest domeniu pînă în 1962 sînt armonios asamblate într-o prezentare sistematică și ușor accesibilă.

În sfîrșit, în ultima parte a cărții literatura existentă ar fi putut servi autorilor ca bază pentru prezentarea rezultatelor imunoelectroforetice obținute și pe alte medii biologice cu rol fiziologic important, ca, de exemplu, saliva, sucul gastric etc.

Analiza imunoelectroforetică este o carte care se citește și se asimilează ușor, avînd principala calitate care se cere publicațiilor științifice: claritatea. Deși diferitele capitole au fost scrise de 22 de autori, materialul a fost excelent omogenizat de cei doi editori; în cuprinsul cărții nu apar repetiții supărătoare și, ceea ce este mai important, se păstrează o terminologie și o nomenclatură unitară.

Cartea are aproape 700 de trimiteri bibliografice și este prevăzută la sfîrșit cu un detaliat index de subiecte, ceea ce permite valorificarea maximă a materialului pe care îl cuprinde.

Apărută în admirabile condiții grafice (o mențiune specială pentru coperta și supracoperta sobră), cu ilustrații (imunoelectroforegrame) pe care se pot urmări și cele mai fine detalii, ediția engleză a monografiei *Analiza imunoelectroforetică* este de mare folos celor interesați în aplicarea sau cunoașterea acestei noi și deja populare metode de analiză biochimică (imunochimică).

Victor Gheție
Institutul de biochimie al
Academiei R.P.R., București

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

1965 AUG 28

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI şi I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 96 p., 3,65 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

R. PORTOCALĂ şi N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie**, 180 p., 9,90 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN şi N. CARP, **Histochimia mucopolizaharidelor**, 284 p. + 24 pl., 20 lei.

C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală**, vol. I, 747 p. + 4 pl. + 2 pl. color, 41 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 8, NR. 2, P. 125—250, BUCUREŞTI, MAI 1965

I. P. Informaţia — c. 1511

43816

Lei 12.—

E 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 8
1965

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 3, p. 251—368, Bucureşti, august 1965

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei R. S. România: EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei R. S. România: M. MEZINCESCU, I. VASILESCU, TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an

Preţul unui abonament anual este de 48 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134—135, Bucureşti, R.S. România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie"

ADRESA REDACŢIEI:

Bucureşti, *str. Docenţilor nr. 20*
Raionul 30 Decembrie

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 8 (1965) nr. 3

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Unele probleme ale mecanismelor de reglare şi ale structurii materiei vii 253

C. BODEA, E. NICOARĂ, G. ILLYES şi M. ŞERBAN, Carotinoidele din *Arctodiaptomus salinus* (Daday) 271

S. OERIU şi G. ORGHIDAN, Dinamica valorilor vitaminei C în funcţie de vîrstă şi sub acţiunea tratamentului cu cisteină şi folcisteină Oeriu 277

S. OERIU, V. COJOCARU, T. SPANDONIDE, V. APOSTOL şi L. CIURTIN, Hormonii 17-cetosteroizi şi fenol-steroizi în funcţie de vîrstă şi tratament cu substanţe emiţătoare de grupări -SH la oameni 283

I. BRAD, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă Nota II. Studiul comparativ al activităţii catalazei la cerealele de toamnă, în timpul iernii 293

A. CSONTOS, Acţiunea histaminei, adrenalinei şi ACTH-ului asupra activităţii catalazei sanguine 307

G. FURNICĂ, Modificarea complecşilor metal-proteine la proteinele supuse acţiunii radiaţiilor gamma 313

A. KAPRI şi H. ARAŢEI, Biochimia lichidului folicular 319

D. TĂNĂSESCU, Glicoliza aerobă, fosforilaza *a* şi aldolaza în cursul contracţiei musculare 325

NOTE DE LABORATOR

L. BOTOŞĂNEANU, Despicarea totală a plantelor pentru cercetări biochimice comparative 335

V. GHEŢIE, D. MOŢET şi C. DRAGOMIRESCU, Procedeu rapid pentru prepararea agarozei 337

A. KAPRI, Procedeu de obţinere a benzilor cromatografice folosite în metoda Mathias 343

REFERAT GENERAL

H. SLUŞANSCHI, Cîteva observaţii cu privire la folosirea calculelor statistice în cercetările de biochimie 345

RECENZII 363

St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 3, p. 251 — 368, Bucureşti, august 1965

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 253–269 (1965)

UNELE PROBLEME ALE MECANISMELOR DE REGLARE ŞI ALE STRUCTURII MATERIEI VII

ACAD. PROF. DR. **EUGEN MACOVSCHI**

577.22 : 621.391

Rezumat. — Fenomenele care se produc în protoplasmă arată că agenţii excitanţi modifică reversibil structura materiei vii şi că mecanismele de reglare cuprinse în această structură readuc materia vie la starea ei iniţială, după încetarea excitării. Pentru precizarea naturii şi structurii materiei vii, precum şi a mecanismelor ei de reglare, au fost luate în consideraţie procesele de integrare a diferitelor substanţe în structura materiei vii, interrelaţiile corelative dintre componentele acestei materii, modul de transformare a moleculelor în componentele structurii materiei vii, specificul acestei structuri şi participarea unor componente ale structurii materiei vii în mecanismele ei de reglare.

În sprijinul concepţiei referitoare la materia vie au fost aduse unele date experimentale bazate pe cercetarea spectrofotometrică a ouălor de arici-de-mare şi pe urmărirea comportării la coacervare a proteinelor serului sanguin uman.

Mecanismele de reglare din organismele vii prezintă pentru biochimie şi biologie un interes deosebit, deoarece cunoaşterea lor contribuie la lămurirea diferitelor procese ale vieţii şi deschide posibilităţi tot mai eficiente de dirijare a acestor procese în folosul medicinii, agronomiei şi al altor ramuri ale biologiei aplicate. Cele mai importante sînt mecanismele de reglare de la nivelul subcelular, datorită atît conexiunii lor strînse cu fenomenele fundamentale ale vieţii protoplasmei, cît şi rolului pe care-l îndeplinesc în menţinerea integrităţii şi stării funcţionale normale a celulelor. Printre astfel de mecanisme se pot menţiona: reglarea metabolică a sintezei acidului ribonucleic la bacterii; reglarea reduplicării normale a acidului dezoxiribonucleic; mecanismele de represie în reglarea biosintezei enzimelor; modificările structurale ale enzimelor ca mecanisme de reglare al propriei lor activităţi; represia prin cataboliţi etc. [1].

Multe mecanisme de reglare din protoplasmă sînt încă nelămurite. Aşa, de exemplu, este ştiut că sub acţiunea diferiţilor agenţi excitanţi — ca: impulsuri electrice, substanţe iritante, acţiuni mecanice, diferenţe de temperatură etc. — şi aproape independent de natura acestor agenţi se produc în protoplasma vie anumite fenomene, cum sînt variaţii ale viscozităţii, eliberarea ionilor de potasiu, pătrunderea în celule a ionilor

de sodiu, apariţia sarcinilor electrice negative la nivelul locului excitat, accentuarea tendinţei de fixare de către protoplasma excitată a anumitor coloranţi, variaţii ale gradului de dispersie a coloizilor şi altele. Se ştie de asemenea că, după încetarea acţiunii agenţilor excitanţi, protoplasma revine mai mult sau mai puţin repede la starea ei iniţială, dacă acţiunea agentului excitant a fost relativ slabă şi de scurtă durată. Se înţelege că reversibilitatea fenomenelor amintite şi revenirea protoplasmei la starea ei iniţială se datoresc unor mecanisme de reglare. Or, tocmai natura şi modul de acţiune al acestor mecanisme sînt încă nelămurite, deşi unele teorii — ca: teoria membranei, teoria sorbţiunii şi altele — au adus contribuţii preţioase atît la descoperirea diferitelor fenomene care se produc în protoplasmă sub acţiunea agenţilor excitanţi, cît şi la explicarea lor.

Fără a subestima rolul teoriilor amintite în descifrarea fenomenelor care se produc în protoplasmă şi importanţa rezultatelor obţinute, considerăm că încercări de elaborare a unor noi ipoteze de lucru în acest domeniu pot prezenta interes. De altfel, teoriile membranei, sorbţiunii şi altele, deşi principial se deosebesc profund între ele, au totuşi o bază comună: toate izvorăsc din concepţia actuală despre alcătuirea materiei cuprinse în organismele vii. Conform acestei concepţii, protoplasma — considerată în totalitatea ei ca materie vie — este alcătuită din numeroase componente bine definite din punct de vedere chimic, între care se produc nenumărate reacţii chimice, al căror ansamblu constituie metabolismul. Spre deosebire de chimismul obişnuit, metabolismul se caracterizează prin aceea că toate reacţiile lui chimice sînt coordonate în timp şi spaţiu, îmbinîndu-se armonios în cadrul unei anumite ordini orientate spre autoconservarea şi autoreproducerea protoplasmei, în concordanţă cu condiţiile mediului ambiant. Se consideră că viaţa este condiţionată de desfăşurarea normală a metabolismului, că diferitele fiinţe vii se deosebesc între ele prin particularităţile metabolismului lor, că transformarea unor fiinţe cu anumite însuşiri în alte fiinţe, cu alte însuşiri implică modificarea tipului lor de metabolism şi că moartea depinde de încetarea metabolismului, adică de încetarea coordonării în timp şi spaţiu a transformărilor chimice care se produc în organism [2] [3].

Se înţelege că o schimbare a punctului de vedere cu privire la alcătuirea materiei din care sînt formate fiinţele vii poate duce la schimbarea modului de înţelegere şi interpretare a diferitelor fenomene care se produc în protoplasmă şi poate deschide perspective noi de investigare a mecanismelor ei de reglare.

Într-o serie de lucrări anterioare am formulat — sub formă de ipoteză — o nouă concepţie cu privire la materia cuprinsă în organisme [4—10]. Conform acestei concepţii, protoplasma vie este alcătuită din două feluri distincte de materie, formate din aceleaşi particule materiale:

materia vie şi materia nevie, care se întrepătrund şi se află în relaţii de coexistenţă funcţională. Materia vie există numai în protoplasma vie; ea se formează prin asimilaţia diferitelor substanţe provenite din materia nevie coexistentă, are o structură cu totul specială, aflată pe o treaptă superioară de organizare, şi imprimă protoplasmei acele însuşiri şi stări specifice ale căror manifestări urmează legi biologice. În schimb, materia nevie din protoplasmă este alcătuită din diferiţi compuşi chimici organici şi anorganici care, împreună cu materia vie, condiţionează viaţa protoplasmei. Considerăm că viaţa depinde de existenţa materiei vii, că diferitele fiinţe se deosebesc între ele prin particularităţile structurii materiei lor vii, că transformarea unei fiinţe cu anumite însuşiri în alte fiinţe cu alte însuşiri implică modificarea structurii materiei vii cuprinse în fiinţele respective şi că moartea depinde de destrămarea structurii materiei vii, cu care ocazie din această structură se eliberează compuşii chimici din care a fost alcătuită. Procesele chimice care se produc la nivelul materiei nevii din protoplasmă reprezintă biochimismul acesteia, pe cînd asimilaţia (integrarea substanţelor chimice în structura materiei vii), dezasimilaţia (ieşirea componentelor chimice din structura materiei vii) şi transformările de ordin chimic care se produc la nivelul componentelor structurii materiei vii reprezintă metabolismul ei.

Examinarea raporturilor dintre protoplasmă şi agenţii excitanţi de pe poziţiile acestei concepţii despre materia din care sînt alcătuite fiinţele vii duce la cîteva concluzii care deschid calea spre cunoaşterea mecanismelor de reglare cuprinse în structura acestei materii.

Să luăm mai întîi în consideraţie faptul că numai protoplasma vie prezintă însuşirea excitabilităţii, deoarece numai ea răspunde într-un mod cu totul caracteristic la acţiunea agenţilor excitanţi; după moartea protoplasmei, ea, ca orice formaţiune alcătuită numai din materie nevie, este indiferentă la acţiunea acestor agenţi. Cum, în conformitate cu ipoteza noastră, protoplasma vie este alcătuită atît din materie vie cît şi din materie nevie şi cum materia nevie ca atare nu răspunde la acţiunea agenţilor excitanţi, înseamnă că însuşirea specifică a protoplasmei de a răspunde în mod caracteristic la acţiunea agenţilor excitanţi se datoreşte materiei vii pe care o conţine.

Se ştie că, în stare de excitaţie, protoplasma prezintă alte comportări şi deci alte însuşiri decît în stare neexcitată (în stare de repaus). Deoarece sub acţiunea agenţilor excitanţi însuşirile protoplasmei se modifică şi deoarece, conform ipotezei noastre, însuşirile protoplasmei sînt condiţionate de însuşirile materiei vii, înseamnă că agenţii excitanţi modifică însuşirile materiei vii din protoplasmă.

Să aplicăm la concluzia precedentă principiul general al interdependenţei dintre structură şi însuşiri. Din moment ce agenţii excitanţi modifică însuşirile materiei vii din protoplasmă, iar modificările însuşirilor sînt condiţionate de modificări ale structurii, înseamnă că sub acţiunea agenţilor excitanţi structura materiei vii suferă anumite modificări.

Se cunoaşte că ansamblul fenomenelor care se produc în cursul excitaţiei protoplasmei este totdeauna aproape acelaşi, indiferent de natura agentului excitant [11]. Aceasta înseamnă că sub acţiunea diferiţi-

lor agenţi excitanţi însuşirile protoplasmei se modifică cam în acelaşi fel. Cum însă modificările asemănătoare ale însuşirilor se datoresc unor modificări asemănătoare ale structurii, înseamnă că agenţii excitanţi, indiferent de natura lor, provoacă în materia vie apariţia unor modificări structurale asemănătoare.

În fine, să luăm în consideraţie constatarea că fenomenele care se produc în protoplasmă sub acţiunea agenţilor excitanţi sînt reversibile dacă intensitatea şi durata acţiunii acestor agenţi nu depăşesc anumite limite. Întrucît reversibilitatea acestor fenomene indică reversibilitatea modificărilor însuşirilor protoplasmei, şi deci ale însuşirilor materiei ei vii, şi întrucît modificările însuşirilor materiei vii sînt condiţionate de modificările corespunzătoare ale structurii acestei materii, înseamnă că în condiţiile menţionate modificările structurii materiei vii sînt reversibile.

În schimb, acţiunile prea intense şi de prea lungă durată ale agenţilor excitanţi duc la modificări nereversibile ale structurii materiei vii. Dacă o astfel de modificare nereversibilă nu împiedică existenţa structurii acestei materii, atunci protoplasma continuă să trăiască, prezentînd unele însuşiri şi comportări noi, deosebite de cele ale protoplasmei iniţiale şi corespunzătoare noilor aspecte ale structurii materiei ei vii. Dacă însă modificarea nereversibilă a structurii materiei vii provocată de agentul excitant este atît de însemnată încît integritatea acestei structuri nu se mai poate menţine, atunci începe desfăşurarea acelor procese care duc la destrămarea structurii materiei vii şi, prin aceasta, la moartea protoplasmei.

Reversibilitatea modificărilor structurii materiei vii, care se manifestă în mod curent sub acţiunea agenţilor excitanţi, indică existenţa în însăşi structura acestei materii a unor mecanisme de reglare, datorită cărora — după încetarea acţiunii agentului excitant — structura modificată poate reveni la starea ei iniţială. De aceea precizarea naturii şi modului de acţiune a acestor mecanisme, care fac parte integrantă din structura materiei vii, necesită în primul rînd cunoaşterea — măcar principială — a acestei structuri. Vom lua deci în consideraţie, în măsura posibilităţilor actuale, problema structurii materiei vii, urmînd ca apoi să revenim la mecanismele ei de reglare.

În lucrările anterioare s-a arătat că, în conformitate cu ipoteza noastră, materia vie se formează prin asimilaţie, adică prin integrarea diferitelor substanţe într-o structură cu totul specială, care, în comparaţie cu structura şi organizarea materiei nevii din protoplasmă, se află pe o treaptă superioară de organizare. Prin integrare în această structură, caracteristică numai materiei vii, substanţele asimilate încetează a fi ceea ce au fost, participă într-un mod nou la manifestarea însuşirilor şi stărilor materiei în structura căreia s-au încadrat şi îşi exercită aici funcţii noi, pe care nu le-au avut înainte de asimilaţie şi pe care nu le pot exercita decît în cadrul acestei structuri. Astfel devine posibilă manifestarea acelor însuşiri specifice materiei vii care depăşesc chimismul şi permit desfăşurarea fenomenelor şi stărilor specifice vieţii, supuse legilor biologice [6 ; p. 470] [9 ; p. 6—7].

Pentru intuirea mai clară a interacțiunilor care se manifestă între componentele structurii materiei vii și efectele interacțiunilor asupra acestor componente, să examinăm, de exemplu, mersul procesului de asimilație. Orice particulă materială (moleculă, radical, ion) care prin asimilație se integrează în structura materiei vii intră în interacțiune cu componentele existente în această structură. Influențele reciproce dintre noua particulă și celelalte componente ale structurii fac ca atît particula cît și aceste componente să sufere anumite „deformări" *. Deși încă nu se pot aduce precizări cu privire la natura și la felul de manifestare a interacțiunilor și deformărilor respective, totuși se poate susține că apariția acestor „deformări" modifică condițiile de manifestare a interacțiunilor ; în consecință, apar noi „deformări", urmate de noi modificări ale condițiilor interacțiunii etc. Astfel, particula care se asimilează își pierde progresiv specificul și autonomia sa și devine parte integrantă a unei structuri în care toate celelalte componente, unite de mai înainte prin legături corelative, și-au pierdut de asemenea specificul și autonomia lor. Dar interacțiunile dintre componentele structurii materiei vii continuă să evolueze și după asimilare, adică după integrarea particulei în materia vie ; aceste interacțiuni devin tot mai puternice, „deformările" componentelor respective tot mai pregnante și conexiunile dintre ele tot mai complexe.

Evoluția interacțiunilor și repercusiunile lor atît asupra particulei asimilate cît și asupra componentelor structurii materiei vii reprezintă deci un proces complicat, a cărui desfășurare în timp este condiționată de numeroși factori, ca : natura și starea particulei care se asimilează, natura și starea componentelor materiei vii din apropierea locului unde se produce asimilația, starea generală a structurii materiei vii în perioada respectivă, influența altor fenomene care se produc în materia vie concomitent cu asimilația etc. Cursul acestui proces poate fi diferit, variind între desfășurări lente, cu caracter de continuitate, și desfășurări bruște, însoțite de salturi și discontinuități generatoare de noi condiții capabile să influențeze mersul ulterior al procesului. De altfel, fenomene asemănătoare celor descrise se pot produce la nivelul componentelor structurii materiei vii nu numai în cursul asimilației, dar și în cazul altor manifestări ale vieții. Astfel, structura materiei vii, în care legăturile corelative dintre componente joacă un rol însemnat, apare ca un „întreg" aflat în continuă dezvoltare și în cadrul căruia se realizează forma biologică de mișcare a materiei, superioară formelor de mișcare fizică și chimică.

Deși nu dispunem încă de date concrete cu privire la componentele materiei vii, totuși putem menționa aici o părere relativă la ele, formulată în unele lucrări anterioare [6] [9]. Astfel, admițînd că ființele vii se deosebesc între ele prin particularitățile structurii materiei lor vii [6 ; p. 472], s-a arătat că integrarea în materia vie a diferitelor substanțe, ca proteine, acizi nucleici, fosfolipide și altele, nu implică numaidecît modificarea structurii lor chimice proprii. În adevăr, dacă prin asimilație proteinele,

* Sub termenul general de „deformare" vom înțelege aici orice modificare, indiferent de natura ei, care se produce la nivelul componentelor materiei vii sub influența interacțiunilor cu alte componente ale acestei materii.

acizii nucleici şi alte substanţe şi-ar pierde sau şi-ar modifica nereversibil structura lor chimică, atunci nu ar fi posibilă menţinerea calităţii materiei vii, caracteristică fiecărui fel de organisme în parte [9 ; p. 7].

Dacă structura chimică a substanţelor care intră în compoziţia materiei vii nu se modifică principial în urma integrării în materia vie, înseamnă că „deformările" care se produc la nivelul lor în interiorul materiei vii afectează nu atît structura lor chimică primară, cît structurile de ordin superior.

Se înţelege că fenomenul „deformării" şi menţinerea unei componente în stare „deformată" necesită un aport de energie, şi de aceea problema raporturilor energetice atît dintre componentele materiei vii, cît şi dintre materia vie şi materia nevie a protoplasmei, prezintă un interes deosebit şi va forma obiectul unei alte lucrări.

Aici vom lua în consideraţie numai faptul că fenomenul deformării este un proces care se petrece în timp, cu viteza v_1. Deformările pot fi reversibile şi nereversibile. Numai în primul caz particula „deformată" poate reveni la forma şi starea ei „normală" după încetarea acţiunii forţelor care au deformat-o. Revenirea aceasta constituie şi ea un proces care se desfăşoară cu viteza v_2. Este evident că vitezele v_1 şi v_2 ale acestor două procese depind de natura particulei care este deformată, de natura şi puterea forţelor care produc deformarea, de gradul de „deformare" realizat de condiţiile în care deformarea sau revenirea are loc etc.

Consideraţiile de mai sus capătă o anumită semnificaţie dacă sînt corelate cu viteza V a procesului de destrămare a structurii materiei vii, viteză care variază şi ea în funcţie de natura materiei vii care se destramă, de condiţiile în care se produce moartea protoplasmei etc. Dacă $V < v_2$, adică viteza de destrămare a structurii materiei vii este mai mică decît viteza de revenire a unei componente „deformate" la starea ei „normală", componenta respectivă va fi eliberată din această structură în starea ei „normală". Dacă $V > v_2$, adică viteza de destrămare a structurii materiei vii este mai mare decît viteza de revenire a unei componente „deformate" la starea ei „normală" situaţia se prezintă altfel : nefiind încheiat pînă în momentul eliberării componentei respective din structura materiei vii, procesul revenirii ei la starea „normală" continuă să se desfăşoare şi după ce această componentă, încă „deformată", a ieşit din structura menţionată şi a început să facă parte din compoziţia materiei nevii.

De altfel, procesul destrămării structurii materiei vii în timpul morţii protoplasmei nu trebuie înţeles ca un proces ce duce la eliberarea componentelor acestei structuri direct şi exclusiv sub forma de molecule izolate. Este probabil că, în funcţie de împrejurări, destrămarea materiei vii duce la apariţia unor fragmente mai mari şi mai mici, în cadrul cărora se creează acele condiţii speciale care permit stabilirea legăturilor chimice noi dintre componentele lor aflate încă în stare „deformată", luînd astfel naştere compuşi chimici noi, care nu preexistau în structura materiei vii.

Acum se poate face o comparaţie principială între componentele materiei vii şi moleculele din care este alcătuită materia nevie a protoplasmei, precum şi între cele două feluri de materie coexistente în protoplasmă.

O moleculă din materia nevie a protoplasmei poate fi izolată ca atare. O componentă a materiei vii din protoplasmă nu poate fi izolată ca atare.

O moleculă poate exista ca atare în afara materiei nevii din care a făcut parte. O componentă a materiei vii nu poate exista ca atare în afara materiei vii în care este integrată.

Existenţa unei molecule în materia nevie nu necesită un aport continuu de energie. Existenţa unei componente în materia vie necesită un aport continuu de energie.

Structura unei molecule aflate în materia nevie a protoplasmei nu evoluează continuu; în general, ea nu se modifică decît în cazul unei reacţii chimice, cu care ocazie se schimbă şi natura însăşi a moleculei. Structura unei componente a materiei vii este în continuă evoluţie; ea se modifică progresiv, fără însă a se ajunge în general la schimbarea naturii componentei respective, adică fără a deveni structura unei alte componente.

În interiorul materiei nevii moleculele îşi păstrează specificul şi autonomia lor şi de aceea materia nevie a protoplasmei se prezintă ca o formaţiune de natură dispersă şi caracter discret. În interiorul materiei vii componentele ei, unite prin legături corelative, îşi pierd specificul de molecule şi autonomia, şi de aceea materia vie a protoplasmei se prezintă ca o formaţiune de natură continuă şi cu caracter unitar.

Între moleculele aflate în materia nevie şi componentele materiei vii există raporturi de transformabilitate reciprocă : prin asimilaţie moleculele se transformă în componente ale materiei vii şi invers : prin dezasimilaţie sau destrămare a structurii materiei vii componentele ei se transformă în molecule. Rezultă că o moleculă, integrîndu-se prin asimilaţie în structura materiei vii, îşi pierde ceea ce îi este specific şi astfel încetează de a mai fi moleculă, deşi redevine moleculă atunci cînd se desprinde din structura materiei menţionate. Prin urmare — deşi pare paradoxal — molecula integrată în structura materiei vii este, şi totodată nu mai este, ceea ce a fost înainte de integrare.

În aceste condiţii se înţelege că moleculele care, prin asimilaţie, devin componente ale materiei vii prezintă în noua lor calitate însuşiri şi stări deosebite de cele pe care le-au avut atunci cînd erau în stare de molecule. Datorită acestor stări cu totul speciale ale componentelor materiei vii şi datorită legăturilor corelative care se stabilesc între ele structura materiei vii reprezintă un „întreg", în care modificările provocate de agenţii externi şi interni la nivelul unora dintre componentele structurii se transmit altor componente şi se repercutează asupra întregii structuri. La rîndul lor, posibilităţile de modificare a componentelor depind de specificul structurii însăşi şi sînt condiţionate de aceasta. Pentru aceste motive, caracterul reacţiei structurii materiei vii la acţiuni externe şi interne depinde atît de starea componentelor cît şi de starea structurii în ansamblul ei.

Tot din aceleaşi motive, componentele materiei vii pot exercita în structura acestei materii anumite funcţii şi pot participa la diferite mecanisme ale proceselor vieţii, în cu totul alte condiţii decît atunci cînd ele, ca molecule, se află în afara structurii materiei vii. Astfel, componentele

materiei vii își exercită funcțiile lor legate de viață (funcțiile biologice) numai atunci cînd sînt în acea stare specială pe care o au în cadrul structurii materiei vii și numai atunci cînd fac parte integrantă din această structură. Prin urmare, cunoașterea funcțiilor biologice ale componentelor materiei vii, descifrarea naturii fenomenelor elementare ale vieții și a mecanismelor cuprinse în structura materiei vii, precum și stabilirea legilor după care se produc aceste fenomene și funcționează mecanismele amintite, necesită cercetarea comportării componentelor respective în însăși structura materiei vii, adică impune efectuarea cercetărilor adecvate pe material biologic viu. Oricît de multilaterală, profundă și ingenioasă ar fi investigarea materiei nevii din protoplasmă, precum și a materialului biologic omorît, ea nu permite soluționarea problemelor menționate.

Dar nu numai atît. Structura materiei vii, fiind un sistem în continuă dezvoltare, are un istoric propriu. De aceea elucidarea naturii și legității interrelațiilor și interacțiunilor, și deci a conexiunilor dintre componentele acestei structuri, nu poate fi realizată exclusiv prin cercetarea lor într-o singură formă dată, într-o singură fază de dezvoltare, faza materiei vii actuale; ea implică cercetarea istoricului apariției materiei vii în cadrul general al evoluției materiei, cercetarea aceasta fiind necesară pentru stabilirea modului de devenire și de dezvoltare a conexiunilor menționate, cu toate schimbările de ordin cantitativ și calitativ care au intervenit pe parcurs la nivelul lor. Astfel, cele două probleme fundamentale ale biologiei : pe de o parte natura și structura materiei vii, iar pe de altă parte geneza acestei materii, formează un tot inseparabil atît din punct de vedere filozofic, cît și din acela al investigațiilor experimentale.

Se înțelege, de asemenea, că structura *sui generis* a materiei vii depășește cadrul unei structuri chimice. Ea este o structură biologică, bazată pe cea chimico-fizică, și reflectă în organizarea ei stadiul superior — biologic — al dezvoltării materiei. Manifestările materiei vii urmează legi biologice, iar transformările de ordin chimic și fizic care se produc în interiorul acestei materii se supun, evident, legilor chimice și fizice, dar în alte condiții decît în chimia și fizica materiei nevii. Tot de aici rezultă că particularitățile structurii fac ca însușirile materiei vii să aibă specificul lor propriu și de aceea ele nu pot fi deduse din însușirile substanțelor din care se formează această structură și nici nu pot fi reduse la acestea. Rezultă că, datorită naturii sale speciale, structura materiei vii depășește posibilitățile unei investigații pur chimice; ea nu poate fi concepută numai de pe pozițiile fizicii și chimiei, și astfel se explică dificultățile care stau în calea cunoașterii ei.

Se mai înțelege că o structură superioară unei structuri chimice nu poate fi reprezentată și exprimată numai prin simbolurile chimice actuale. După cum în matematică apariția fiecărui gen nou de calcul a necesitat introducerea unor simboluri noi, adecvate, tot așa și cercetarea structurii materiei vii va necesita elaborarea unei simbolistici noi, capabile să exprime și să reprezinte compoziția, raporturile, stările și funcțiile diferitelor componente ale acestei structuri vii, aflate în stare de continuă evoluție și transformare, precum și fenomenele biologice elementare care se produc în materia vie și mecanismele cuprinse în structura ei.

Pentru a ilustra procesul de integrare a moleculelor diferitelor substanțe în structura materiei vii și modul lor de participare ca părți componente ale acestei structuri la manifestarea însușirilor materiei respective, vom face o comparație între integralitatea structurii materiei vii și aceea a structurii unui joc sportiv de echipă, deși tipurile de integralitate ale celor două structuri se deosebesc profund între ele.

Să comparăm deci oamenii cu moleculele celor mai diferite substanțe, iar pe sportivii care se pot încadra în formația (structura) unei echipe cu moleculele acelor substanțe care se pot încadra în structura materiei vii. Cît timp sportivii se află în condițiile vieții lor particulare, formal ei nu se deosebesc de oamenii din celelalte categorii ; tot așa sînt și moleculele substanțelor încadrabile în structura materiei vii : formal ele nu se deosebesc de moleculele celorlalte categorii de substanțe. În fond însă, anumite deosebiri există : sportivii se deosebesc de alți oameni prin anumite însușiri (cunoștințe speciale, antrenament etc.) datorită cărora îndeplinesc acele condiții care le permit, la un moment dat, să intre în alcătuirea unei echipe și să participe direct la „jocul sportiv" ; moleculele substanțelor incadrabile în structura materiei vii de asemenea se deosebesc de moleculele altor substanțe prin anumite însușiri (însușirea de a intra în interacțiune cu componentele materiei vii, însușirea de a se deforma etc.) datorită cărora îndeplinesc acele condiții care le permit la un moment dat să intre în alcătuirea materiei vii și să participe direct la „jocul vieții".

Pentru a participa la joc, sportivul trebuie în prealabil transformat în jucător : el trebuie să vină pe stadion, să-și modifice înfățișarea îmbrăcînd uniforma echipei sale, să ocupe pe teren locul corespunzător funcției pe care o va îndeplini în cursul jocului și să se integreze în păienjenișul acelor interrelații și interacțiuni cu ceilalți jucători de pe teren care sînt determinate de regulile (legile) „jocului". Din momentul acesta, sportivul devine jucător — adică parte integrantă a structurii echipelor aflate pe teren. Dar, devenind jucător, sportivul își pierde principial specificul său personal, de „omul", cu toate calitățile și defectele sale ; totodată, el își pierde și independența sa. În adevăr, de acum înainte, participînd la „joc", el, în principiu, nu se mai manifestă ca om, ci ca „jucător", prezentînd de data aceasta specificul său de „jucător", cu toate calitățile și defectele respective ; totodată, el nu mai este independent, ci aparține structurii în care s-a integrat și în care poate acționa numai în cadrul mecanismelor structurii și numai conform legilor ei. Prin aceasta jucătorul, în timpul cît joacă, se deosebește calitativ nu numai de oricare alt om, nu numai de orice sportiv care nu este cuprins în joc, dar chiar și de el însuși cînd, ca simplu sportiv, se află în afara jocului la care participă acum.

La fel și în cazul materiei vii. Pentru a participa la „jocul vieții", molecula substanței integrabile în materia vie trebuie să fie transformată în prealabil în componenta acestei materii. Ea trebuie să pătrundă și să se integreze în materia vie, trebuie să-și modifice „înfățișarea", deformîndu-se într-un fel sau în altul, trebuie să ocupe în structura materiei vii locul corespunzător funcției pe care o va îndeplini în cursul „jocului" și să se integreze în păienjenișul acelor interrelații și interacțiuni cu celelalte

componente ale materiei vii care sînt determinate de legile „jocului vieţii". Din momentul acesta molecula devine componenta materiei vii, adică parte integrantă a acestei materii. Dar, devenind componenta materiei vii, molecula îşi pierde atît specificul său, cît şi independenţa sa. În adevăr, de acum înainte, participînd la „jocul vieţii", ea nu se mai manifestă ca moleculă, ci ca o componentă a materiei vii şi, totodată, nu mai este independentă, ci aparţine structurii în care s-a integrat şi în care poate acţiona numai în cadrul mecanismelor acestei structuri şi numai conform legilor ei. Prin aceasta, componenta materiei vii se deosebeşte calitativ nu numai de oricare altă moleculă, nu numai de orice moleculă integrabilă în materia vie, dar chiar şi de ea însăşi cînd, ca moleculă, se află în afara structurii materiei vii, în care se găseşte acum.

Începe jocul. După cum jucătorii îşi exercită funcţiile lor specifice numai atunci cînd joacă încadraţi în structura formaţiilor aflate pe teren, tot aşa şi componentele materiei vii îşi exercită funcţiile lor specifice numai atunci cînd „joacă" încadrate în structura acestei materii. Mai mult: după cum observarea cît de atentă a sportivilor aflaţi în afara structurii jocului nu permite descoperirea funcţiilor lor de jucători, şi nici a mecanismului şi regulilor (legilor) „jocului" respectiv, tot aşa cercetarea cît de multilaterală şi de ingenioasă a substanţelor aflate în afara structurii materiei vii nu poate permite stabilirea funcţiilor componentelor respective în „jocul vieţii", a mecanismelor de desfăşurare a acestui „joc" şi a legilor acestui „joc" de care depinde existenţa a tot ce este viu.

Jocul o dată terminat, interrelaţiile şi interacţiunile încetează, iar structura în cadrul căreia el s-a desfăşurat se destramă: jucătorii părăsesc terenul, „scot" uniforma de jucător şi se îmbracă în haine civile, revenind la aspectul lor „normal" de sportiv; iar componentele materiei vii părăsesc structura acestei materii, „scot" deformările lor şi revin la starea „normală" de molecule.

Observăm că viteza cu care foştii jucători trec de la starea de jucător la starea de sportiv, schimbîndu-şi îmbrăcămintea etc., poate reprezenta, într-o oarecare măsură, viteza v_2 cu care componentele „deformate" — ieşite din structura materiei vii — revin la starea lor „normală". Şi cum, o dată cu jocul terminat, structura jocului se destramă destul de repede (viteza V fiind mare), iar timpul necesar transformării jucătorilor în sportivi care pleacă acasă este destul de îndelungat (v_2 fiind mic), înseamnă că în acest caz sîntem în situaţia cînd $V > v_2$. O situaţie similară în cazul materiei vii va fi prezentată la sfîrşitul acestei lucrări.

Este evident că această comparaţie între „jocul vieţii" şi „jocul sportiv" nu este perfectă şi, ca orice comparaţie, are calităţile şi defectele ei. Este însă important faptul că ea ne arată limpede cum poate fi concepută materia vie din punctul de vedere al naturii şi structurii ei; ne ajută să înţelegem cum o moleculă, cu însuşirile ei specifice, se modifică calitativ şi capătă cu totul alte însuşiri, deosebite calitativ de primele, atunci cînd ca o componentă se integrează în structura materiei vii (structură de ordin superior) şi ne dovedeşte indirect că componentele materiei vii exercită anumite funcţii în mecanismele cuprinse în structura acestei materii.

Prin urmare, din punctul de vedere al cercetărilor ce urmează să fie efectuate pe materialul biologic viu, pentru stabilirea naturii, structurii şi manifestărilor atît ale materiei vii, cît şi ale componentelor ei, situaţia cercetătorului devine comparabilă cu aceea a unui spectator neiniţiat în joc, care, adus pe stadion, priveşte din tribună desfăşurarea meciului, fără să fi primit vreo explicaţie prealabilă, adică fără să fi cunoscut rolul (funcţia) fiecărui jucător în parte, modul (mecanismul) de desfăşurare a jocului şi regulile (legile) lui. Acest spectator observă şi studiază jocul : la început nu înţelege nimic, dar pe măsură ce timpul trece şi începe să sesizeze diferite aspecte ale meciului îşi dă tot mai bine seama de cele ce se petrec pe teren, pînă cînd, descoperă rînd pe rînd secretele jocului la care asistă. La fel vom proceda în cazul materiei vii. Cercetînd metodic această materie şi urmărind tot ce se petrece în ea, vom descoperi şi vom cunoaşte atît natura şi starea componentelor din care este alcătuită, funcţiile lor în materia vie, fenomenele biologice elementare care se produc în această materie, modul de funcţionare a diferitelor mecanisme cuprinse în structura ei, precum şi legile cărora li se supune această materie.

Precizările de mai sus cu privire la structura materiei vii sînt suficiente pentru a ne permite să revenim la problema mecanismelor de reglare cuprinse în această structură. Pentru aceasta, luăm întîi în consideraţie că manifestarea fenomenelor parţiale ale proceselor de reglare şi succesiunea lor algoritmică implică existenţa unei structuri adecvate. Or, aceasta înseamnă că în materia vie există o anumită repartiţie spaţială a componentelor care alcătuiesc formaţiunile structurale ale mecanismelor de reglare şi asigură mersul proceselor cibernetice. De aceea funcţiile componentelor structurii materiei vii din cadrul mecanismelor de reglare pot fi denumite „funcţii cibernetice". Însă „ar fi greu de presupus că multiplele funcţii cibernetice din cadrul structurii dinamice a materiei vii ar putea fi asigurate de moleculele asimilate ale uneia şi aceleiaşi substanţe" [9 ; p. 7], adică de unele şi aceleaşi componente ale structurii materiei vii. „Este mult mai probabil că asemenea funcţii necesită participarea substanţelor cu structuri chimice diferite şi se realizează în materia vie tocmai datorită naturii diferite a substanţelor din care se formează componentele respective" [9 ; p. 8].

S-ar părea că în momentul de faţă ar fi imposibil de precizat, măcar principial, rolul cibernetic pe care diferitele componente din structura materiei vii îl îndeplinesc în mecanismele ei de reglare. Totuşi, există anumite posibilităţi de a pătrunde în acest domeniu, atît de enigmatic încă, dacă se ia în consideraţie că procesul de diferenţiere ce se produce în cursul adaptării unei entităţi biologice (celulă, ţesut, organ) la o anumită funcţie este însoţit de acumulare şi de evoluţia acelor compuşi biochimici care participă la manifestarea funcţiei respective şi de eventualul regres al acelora care nu participă. Prin urmare : dacă prezenţa fosfolipidelor în celula nervoasă este legată de funcţia conducerii excitaţiilor, iar prezenţa anumitor proteine în celula musculară de funcţia contracţiei, înseamnă că aceşti compuşi au evoluat (s-au acumulat în cantitate sporită, s-au „perfecţionat" etc.) o dată cu diferenţierea celulelor amintite în cadrul procesului de adaptare la funcţia corespunzătoare. Desigur, această evoluţie a fost

posibilă datorită împrejurării că încă de la început, de cînd compușii aceștia se aflau în cantitate mică sau sub forma „nedezvoltată" în celule încă nediferențiate, structurile lor chimice prezentau anumite particularități care le-au permis să participe la mecanismele unor fenomene elementare corespunzătoare funcțiilor celulelor diferențiate. De altfel, compușii menționați prezintă, probabil, comportări similare în orice celule ; și anume : fosfolipidele participă la fenomenele elementare de transmisie a excitației, iar proteinele la fenomenele elementare de contracție care se produc în protoplasma excitată.

De aici se desprind primele indicații cu privire la eventuala participare a unora dintre componentele materiei vii la îndeplinirea funcțiilor cibernetice ale mecanismelor de reglare cuprinse în structura acestei materii. În adevăr, conform principiilor ciberneticii, desfășurarea permanentă și automată a unui proces de reglare este asigurată de existența și participarea succesivă a anumitor elemente constitutive, caracteristice, printre care vom aminti aici, spre exemplificare, numai două : „canale" de transmitere a mesajelor purtătoare de comenzi și „organe de execuție" („traductori", „destinatari ai mesajelor") la nivelul cărora se realizează de obicei, mai ales în tehnică, modificări structurale, deplasări mecanice etc. Or, nu ar fi exclus ca, de exemplu, fosfolipidele integrate în materia vie să poată funcționa ca transmițătoare de mesaje, alcătuind, împreună cu alte componente ale materiei vii, „canale de transmisie", iar anumite proteine ca „organe de execuție", reacționînd prin anumite „deformări" la mesajele primite etc.

De altfel, este de remarcat că fosfolipidele cuprind două funcții organice capabile să reacționeze între ele : o grupare fosforică și o grupare colinică sau colaminică, la fel cum aminoacizii cuprind amina și carboxilul, iar nucleotidele gruparea fosforică și hidroxilul secundar al pentozei. Or, compușii biochimici cu două funcții capabile să reacționeze între ele stau la baza „biopolicondensatelor" (în mod curent denumite greșit „biopolimeri") : din aminoacizi se formează proteine, iar din nucleotide acizii nucleici. Prin urmare, faptul că principial cele două funcții organice menționate ale fosfolipidelor pot reacționa stabilindu-se între ele legături ionice pare să indice că și fosfolipidele integrate în structura materiei vii ar putea forma acolo un fel de „biopolicondensate" corespunzătoare. Aceste biopolicondensate fosfolipidice, existente sub formă de componente ale materiei vii, s-ar deosebi profund, prin însușirile lor, de biopolicondensate, ca proteine și acizi nucleici, deoarece legăturile de tip ionic dintre termenii lanțurilor, și poate chiar rețelelor polifosfolipidice le-ar conferi o reacționabilitate extremă și le-ar permite participarea la cele mai rapide fenomene biologice care se produc în protoplasma vie.

Mecanismele autoreglării, precum și mecanismele altor procese biologice din protoplasmă nu se localizează exclusiv în structura materiei vii. Din contră, după cum s-a arătat într-o altă lucrare, se poate admite că „reacțiile biochimice dintre substanțele care alcătuiesc materia nevie a protoplasmei pot induce transformări de ordin chimic în regiunile învecinate ale materiei vii și, invers, diferite transformări intervenite într-o porțiune a materiei vii se pot repercuta asupra biochimismului care se mani-

festă în materia nevie din imediata vecinătate" [6 ; p. 471]. Prin urmare, datorită interdependenței remarcabile dintre fenomenele care se produc în structura materiei vii și cele din materia nevie coexistentă, ambele feluri de materie participă simultan, într-un fel sau altul, la desfășurarea fenomenelor vieții, materia vie avînd, evident, rolul fundamental. Dat fiind că lucrarea aceasta a fost dedicată în special structurii materiei vii și mecanismelor ei de reglare, materia nevie deocamdată nu a fost luată în considerație. De aceea interrelațiilor dintre materia vie și nevie coexistente în protoplasmă, ca și fenomenelor la care ele participă simultan, le va fi consacrată o altă lucrare.

Și acum se pune întrebarea : tot ce a fost expus pînă aici în legătură cu natura și structura materiei vii reprezintă oare numai concepții speculative, sau oglindește realitatea accesibilă cercetării concrete și verificării experimentale ?

Într-o lucrare anterioară s-a precizat că „reactivitatea permanentă a materiei vii este compatibilă numai cu o structură dinamică, aflată în continuă mișcare, ceea ce înseamnă că structura materiei vii prezintă specificul său propriu și nu poate fi asemuită cu nici una dintre structurile cunoscute pînă acum în chimia organică și minerală. De aceea stabilirea acestei structuri va necesita cercetări speciale pe material viu, efectuate cu ajutorul unor metode de investigație noi, ce se vor elabora numai în acest scop" [6 ; p. 472—473]. Prin urmare : domeniul fiind nou, este dificil de abordat. Totuși, chiar de pe acum există două posibilități de a aduce dovezi în sprijinul considerațiilor teoretice expuse pînă aici cu privire la materia vie și la structura ei. Prima constă în reexaminarea unor lucrări efectuate de alți autori pe materialul viu, care deși au urmărit rezolvarea altor probleme, au ajuns la rezultate experimentale concordante cu considerațiile noastre teoretice. A doua posibilitate constă în efectuarea de noi cercetări experimentale, bazate direct pe concepțiile despre natura și structura materiei vii.

Spre exemplificarea primei posibilități, putem lua în considerare acea parte a ipotezei noastre după care moartea protoplasmei depinde de destrămarea structurii materiei ei vii și în eliberarea componentelor chimice din care aceasta a fost alcătuită.Cităm :„Dat fiind că fenomenele vieții, condiționate de existența materiei vii nu se produc după moarte, înseamnă că o dată cu moartea protoplasmei materia ei vie încetează să existe. Or, conform analizelor chimice, materialul biologic care a încetat să trăiască este alcătuit exclusiv din compuși chimici obișnuiți. Înseamnă că o dată cu moartea protoplasmei materia ei vie se destramă, transformîndu-se în diferiți compuși chimici" [6 ; p. 470—471].

În sprijinul acestei concepții pot fi aduse unele date experimentale comparative obținute de F. Vlès și M. Gex pe ouă de arici de mare vii și omorîte. În prima lucrare publicată în 1934 [12] acești autori prezintă o tehnică specială, de obținere, cu ajutorul unui microscop în cvart cuplat cu un spectrofotometru de ultraviolet, a spectrelor de absorbție atît la obiecte microscopice care se comportă ca o lamă plan-paralelă, cît și la cele care au o convergență mai mult sau mai puțin considerabilă. Com-

parînd apoi curbele de absorbţie în ultraviolet ale ouălor de arici de mare (*Paracentrotus lividus* Lk) normale şi citolizate (fig. 1), ei au ajuns la concluzia că, „deşi obţinute în aceleaşi condiţii, spectrele au un aspect foarte diferit", şi „dacă se compară banda proteică observată la oul citolizat cu aceea care se obţine în cazul oului normal se constată deosebiri care indică destrucţia protoplasmatică".

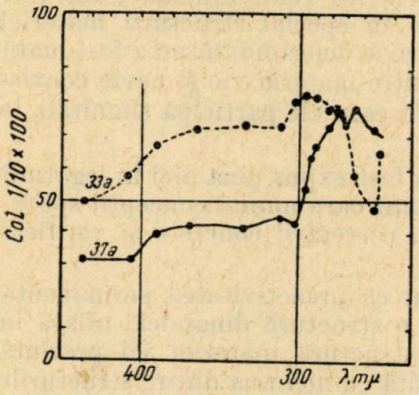


Fig. 1. — Spectrogramele în lumină ultravioletă ale oului de ursin normal (·----·----·) şi citolizat (o———o———o) (λ = 350 mμ).

Rezultate şi mai interesante au fost publicate în 1938 [citat după (13)]. De data aceasta au fost comparate spectrele de absorbţie în ultraviolet ale ouălor de arici de mare normale şi strivite. Referindu-se la această lucrare, A. L. Kursanov (13) a scris în 1940 : „În figura 2 sînt reproduse datele extrase din lucrarea publicată de F. Vlès şi M. Gex, care arată spectrograma, în razele ultraviolete, a ouălor de arici de mare. După cum se vede din această figură, spectrograma *A* a oului de arici de mare se deosebeşte profund de spectrograma *C* a albuminei, deşi oul de arici de mare constă 95% din proteine. Dacă aceste ouă sînt strivite, atunci se obţine curba *B*, care corespunde întru totul cu curba albuminei. Faptul acesta arată că în celula vie există o altă formă chimică a substanţei care se descompune de îndată ce celula este distrusă". „Prin urmare, natura chimică a protoplasmei vii este diferită de natura chimică a protoplasmei muribunde sau moarte" (13).

Astfel, atît datele experimentale menţionate obţinute de F. Vlès şi M. Gex, cît şi concluziile trase de A. L. Kursanov, vin în sprijinul teoriei noastre referitoare la existenţa în protoplasma vie a unei materii vii cu totul speciale, a cărei structură se destramă o dată cu moartea, eliberînd componentele chimice din care a fost alcătuită.

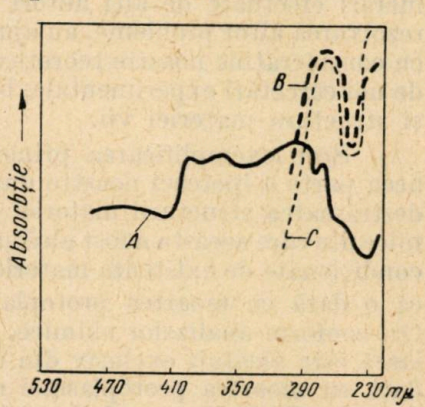


Fig. 2. — Spectrograme în lumina ultravioletă :
A — oul de ursin viu ;
B — oul de ursin strivit ;
C — soluţie de proteină.

Spre exemplificarea celei de-a doua posibilităţi, putem să ne referim la acea parte a ipotezei noastre după care componentele materiei vii integrate în structura acesteia sînt mai mult sau mai puţin „deformate" şi, o dată cu moartea şi destrămarea structurii materiei vii, revin la starea lor „normală". Citäm : „Dacă viteza de destrămare a structurii materiei vii este mai mare decît viteza de revenire a unei componente « deformate » la starea ei

«

normală », atunci, nefiind încheiat pînă la momentul eliberării componentei respective din structura materiei vii, procesul revenirii ei la starea « normală » continuă să se desfăşoare şi după ce această componentă încă « deformată » a ieşit din structura menţionată şi a început să facă parte din compoziţia materiei nevii" (p. 10).

Pentru a aduce date experimentale în sprijinul acestei concepţii, trebuie luat în cercetare, cel puţin pentru început, un material biologic care să prezinte probabilitatea de a conţine materie vie uşor destrămabilă, ca în cazul morţii unui astfel de material materia lui vie să se destrame rapid (viteza de destrămare, V, să fie mare). Printre diferitele ţesuturi, sîngele pare să îndeplinească această condiţie. În adevăr, dacă sîngele — considerat ca un ţesut lichid viu — cuprinde într-o formă sau alta materie vie, atunci, datorită particularităţilor morfologice şi funcţionale ale sîngelui, materia lui vie ar urma să fie mai puţin „consistentă" şi mai uşor destrămabilă decît materia vie a plasmei celulare.

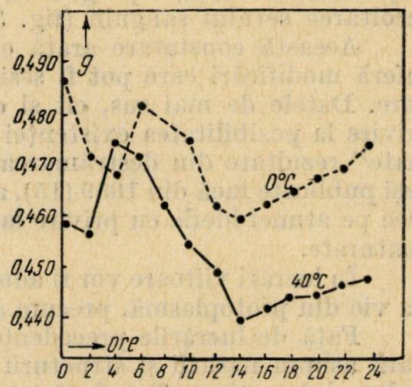


Fig. 3. — Variaţia cantităţii de coacervat în funcţie de starea proteinelor native din serul sanguin. Măsurările s-au făcut din 2 în 2 ore după formarea serului.

Apoi, ar trebui urmărită comportarea unei componente a materiei vii, care să prezinte probabilitatea de a fi cît mai puternic « deformată » atunci cînd face parte integrantă din structura acestei materii. Astfel de componente ar putea fi, de exemplu, proteinele care, datorită structurii lor specifice, se pretează la deformări. Dacă în structura materiei vii proteinele sînt puternic deformate, atunci timpul necesar revenirii lor la starea „normală", după destrămarea structurii materiei vii, are şansă să fie îndelungat (viteza de revenire v_2 să fie mică).

Să admitem deci că după scoaterea sîngelui din organism începe destrămarea rapidă a materiei lui vii şi punerea în libertate a proteinelor încă „deformate", care revin atît de încet la starea lor « normală » încît pot persista în stare încă « deformată » chiar după coagulare ($V > v_2$). Înseamnă că în cazul acesta, serul sanguin proaspăt ar putea conţine unele proteine « deformate », la nivelul cărora s-ar produce modificări ale însuşirilor fizico-chimice legate de trecerea acestor proteine de la starea « deformată » la starea « normală ».

Pentru urmărirea modificărilor menţionate ar trebui aleasă o metodă care să permită sesizarea modificărilor fine ce se produc la nivelul structurilor de ordin superior ale proteinelor „deformate". În acest scop ni s-a părut indicat să recurgem la fenomenul coacervării, deoarece atît comportarea la coacervare a proteinelor, cît şi cantitatea şi calitatea coacervatelor care se formează depind de starea substanţelor proteice [14—16].

În consecinţă, în eprubete conice de centrifugă, prealabil cîntărite se introduceau 2 ml ser sanguin uman, 2 ml de soluţie de gumă arabică

15%, 5,75 ml de apă și 0,25 ml de acid acetic 20%. Coacervatul format se depunea prin centrifugare, iar supernatantul se îndepărta întîi prin sifonare și apoi prin atingerea suprafeței coacervatului cu hîrtie de filtru. Printr-o nouă cîntărire se afla aproximativ greutatea coacervatului format. Determinările se făceau din două în două ore, luîndu-se probe din același ser, păstrat în prealabil timp de 15 min la două temperaturi diferite : 0° și 40°C.

S-a constatat că în ambele cazuri masa coacervatului ce se formează la intervale de timp egale (din două în două ore) nu este aceeași, ci prezintă o variație progresivă cu un minimum după 12—16 ore de la recoltarea serului sanguin (fig. 3).

Această constatare arată că proteinele din serul sanguin proaspăt suferă modificări care pot fi sesizate cu ajutorul fenomenului de coacervare. Datele de mai sus, cît și concluzia respectivă, sprijină ipoteza cu privire la posibilitatea existenței în serul sanguin a unor proteine „deformate" rezultate din destrămarea materiei vii sanguine. Aceste rezultate, deși publicate încă din 1959 (15), au fost prezentate într-un alt cadru, deoarece pe atunci ideile cu privire la structura materiei vii nu erau încă clar conturate.

În lucrări viitoare vor fi aduse noi completări la ipoteza despre materia vie din protoplasmă, precum și alte date experimentale în sprijinul ei.

Față de lucrările precedente, această lucrare permite o vedere mai clară asupra naturii și structurii materiei vii precum și asupra mecanismelor ei de reglare. Totodată, ea aduce primele argumente experimentale în sprijinul ipotezei cu privire la existența unei materii vii în protoplasmă.

Tot din această lucrare se mai desprinde și ideea că cercetarea pe linia chimică clasică a compușilor biochimici din materialul biologic omorît constituie numai prima etapă a investigațiilor îndreptate spre cunoașterea mecanismului vieții și a cadrului în care ea se manifestă. Această etapă este obligatorie, căci numai cunoașterea aprofundată a compușilor biochimici poate permite trecerea la etapa următoare, adică la cercetarea comportării acestora ca părți componente ale structurii materiei vii.

Institutul de biochimie al Academiei R.S.România
și
Catedra de biochimie a Universității București

BIBLIOGRAFIE

1. . * . *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **XXVI**, *Celular regulatory mechanisms*. New York, 1961.
2. A. I. Oparin, *Originea vietii pe pămînt*, Edit. științifică, București, 1960, p. 322 și 336.
3. N. M. Sisakian, *Biochimia metabolismului*, Edit. Acad. de Științe a U.R.S.S., Moscova, 1954, 194—195.
4. E. Macovschi, *Materia vie și geneza ei*, în *Culegere de studii — Materialismul dialectic și științele contemporane ale naturii*, Edit. politică, București, 1959, p. 155.
5. E. Macovschi, *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Rev. de Chimie, **IV**, 1, 11 (1959).
6. E. Macovschi, *Materia vie și rolul ei în hibridarea plantelor*, St. cerc. biochimie, **VI**, 4, 467 (1963).

7. E. Macovschi, *Einige neue Anschauungen über die Natur der lebenden Materie in Beziehung zur Biochemie des Krebses*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **VIII**, *2* (34), 48 (1963).
8. E. Macovschi, *La structure de la matière vivante et quelques aspects cybernétiques de ce problème. (Note préliminaire)*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **IX**, *2* (40), 39 (1964).
9. E. Macovschi, *Unele aspecte cibernetice în problema structurii materii vii*, St. cerc. biochimie, **VII**, 1, 5 (1964). *Nekotorie aspekti kibernetiki i struktura jivoi materii*, Rev. roum. Biochim., **I**, 1, 5 (1964).
10. E. Macovschi, *Kybernetik im Organismischen*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **IX**, *3* (41), 89 (1964).
11. D. N. Nasonov, *Reacția locală a protoplasmei și excitația propulsantă*. Edit. Acad. de Ştiințe din U.R.S.S., Moscova-Leningrad (*Mestnaia reakția protoplasmi i rasprostraneaiusceesia vozbujdenie*, Izd. Acad. Nauk SSSR, Moscova-Leningrad), 1959, 15.
12. F. Vlès et M. Gex, *Sur la structure des spectres ultraviolets de l'œuf d'Oursin. Introduction à une technique de microspectrophotométrie ultraviolette*, Arch. de physique biologique, **XI**, 3, 157 (1934).
13. A. L. Kursanov, *Deistvie fermentov v jivoi kletke*. (Acțiunea fermenților în celula vie), în vol. *Fermenții*, sub red. A. N. Bach și V. A. Engelhardt, Edit. Acad. de Ştiințe a U.R.S.S., Moscova-Leningrad, 1940, p. 222.
14. N. L. Feldmann, *Vlieanie denaturații belkov na koațervati ih s krasiteleami* (Acțiunea denaturării proteinelor asupra coacervatelor lor cu coloranții), D.A.N. SSSR, **74**, 1139 (1950).
15. E. Macovschi și M. Cârsteanu, *Coacervatul dintre proteinele serului sanguin uman și guma arabică*, St. cerc. biochimie, **II**, 2, 111 (1959).
16. D. Moțet-Grigoraș, *Coacervarea fracțiunilor proteice din serul sanguin uman denaturat prin căldură*, St. cerc. biochimie, **IV**, 2, 257 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 271–276 (1965)

CAROTINOIDELE DIN *ARCTODIAPTOMUS SALINUS* (DADAY) *

CORNEL BODEA MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R. S. ROMÂNIA
ELENA NICOARĂ, GHEORGHE ILLYES ŞI MIHAIL ŞERBAN

577.1

Rezumat. — La *Crustacea Copepoda* specia *Arctodiaptomus salinus* (Daday-din lacuri sărate din Transilvania au fost găsite astaxantină, β-carotină, hidroxie-chineonă şi o nouă xantofilă, *3, 4, 3', 4'*-tetrahidroxi-β-carotină, pentru care se propune denumirea de crustaxantină.

Arctodiaptomus salinus (Daday) este o specie de *Crustacea Copepoda* care face parte din subordinul *Calanoida*, familia *Diaptomidae*. Specia a fost descrisă pentru prima dată de către Eugen Daday (1884) [1], care a găsit-o în lacurile sărate de la Turda şi Ocna Sibiului (Transilvania).

Specia este larg răspîndită în apele continentale sărate şi salmastre din Asia Centrală pînă în Europa Apuseană şi Africa de Nord [2]. În Romînia, a mai fost semnalată în bălţile sărate de la Someşeni (Cluj), lacurile Amara şi Schiauca (Bărăgan) [3] şi în lacul Strachina (Slobozia) [4].

Mărimea femelelor este cuprinsă între 1 şi 1, 5 mm, masculii fiind ceva mai mici (1—1,2 mm). Specia este probabil adaptată în mod secundar la apă sărată şi este foarte rezistentă la mari oscilaţii de salinitate.

Lacurile sărate continentale au o faună săracă ; puţinele specii care sînt adaptate acestor condiţii pot da însă deseori populaţii bogate, datorită lipsei de concurenţă din biotop. *Arctodiaptomus salinus* dă astfel proliferări cu o atît de mare densitate de indivizi încît culoarea roşie a animalelor dă o tentă roşcată apei.

Arctodiaptomus salinus este una dintre speciile de *Diaptomidae* cele mai intens colorate. Diaptomidele sînt animale pelagice şi microfage, care se hrănesc mai ales cu nanoplancton vegetal, ce constituie sursa primară a pigmenţilor carotinoidici. În crustacee pigmenţii carotinoidici sînt în general localizaţi în tegument, în ochi şi în ouă. Sacul oviger purtat de femele de *A. salinus* este îndeosebi intens colorat.

Pentru cercetarea pigmenţilor din *Arctodiaptomus salinus* Daday am recoltat probe din lacurile sărate de lîngă Turda. Am observat că specia este mai pigmentată în lunile mai reci şi că în timpul verii este impurificată cu crustacee cladocere.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 3 (1965), în limba engleză.

MATERIAL ŞI METODE

Colectarea şi păstrarea materialului. Materialul biologic a fost colectat în diferite perioade ale anilor 1963 şi 1964. Cele mai bogate recoltări s-au realizat în lunile aprilie, mai şi octombrie. Pentru colectare s-a folosit o plasă din ţesătură deasă de mătase care era purtată în adîncul apei. Curăţirea materialului astfel adunat s-a făcut pe loc prin spălare, folosind site de diferite dimensiuni. Materialul selecţionat, scurs bine de apă, a fost introdus în metanol. În cazul cînd probele au fost păstrate mai mult timp, metanolul a fost reînoit şi deasupra s-a realizat atmosferă de CO_2. Păstrarea materialului prin uscare este neindicată datorită alterării rapide (în cîteva ore).

Separarea sacilor ovigeri de restul materialului biologic s-a realizat prin flotare; la agitare energică cu apă, sacii ovigeri se desprind de corpul femelii şi, fiind mai grei, se depun mai repede.

Extragerea şi separarea pigmenţilor. O cantitate de 1,5—2 kg de *A. salinus* conservat în metanol a fost extrasă cu eter de petrol pînă la epuizare. Extractul, spălat pentru îndepărtarea metanolului şi uscat cu Na_2SO_4 sicc., a fost cromatografiat pe trei coloane (6 × 50 cm) de MgO + nisip (1 : 2). Cromatograma obţinută se prezintă de sus în jos în felul următor:

	Zona	λ *max.* (mμ) (în hexan)	*Pigmentul*
A	3 cm brun-roşcat	—	neidentificat
	5 cm violet	470	astacină (VI *b*)
	1 cm interzonă brunie		
B	16 cm violet	466	astaxantină *trans* total (VI *a*, ester),
C	5 cm violet	457	izomer *cis* de astaxantină
	3 cm portocaliu	480, 448	crustaxantină (IV, ester)
	2 cm interzonă		
D	1 cm violet	456	hidroxiechinenonă (III *a*, ester)
	0,2 cm portocaliu		
	0,1 cm violet		
E	fracţiune galbenă care picură din coloană	478,449	β-carotină

Identificarea pigmenţilor. *Zona A. Astacină* (*VI b*). Pigmentul din Zona A, datorită caracterului său acid, a putut fi eluat numai cu amestec de acetonă şi acid acetic. Spectrul de absorbţie, proba de repartiţie şi comportarea cromatografică corespund pigmentului IV *b* obţinut prin saponificarea esterului de VI *a* din Zona B.

Zona B. Astaxantină (*VI a*). Pigmenţii din Zona B au fost cromatografiaţi pe coloană de zahăr, utilizînd ca developant eter de petrol cu 5% benzen. Se obţin două, uneori trei zone violete. Pigmentul din zona principală prezintă proprietăţi de ceto-ester (λ max. 466 mμ în hexan, spectrul IR benzi la 1690, 1750 cm^{-1}), care prin saponificare eliberează IV *a*, respectiv VI *b* (λ max. 470 mμ; polaritate relativă 1,78 — M_{50}=86,5 — spectrul IR benzi la 1063 şi 1627 cm^{-1} [5]). Cromatograme de amestec pe zahăr cu VI *a* (ester) izolat din *Astacus fluviatilis* şi *Adonius aestivalis* confirmă identitatea pigmentului din zona B cu VI *a*. Pigmentul din zona violetă inferioară are aceleaşi proprietăţi cu cel din zona principală, fiind un izomer *cis* de VI *a*, care, prin păstrare, se izomerizează parţial în forma *trans* totală.

Zona C. Crustaxantină (IV). Pigmentul portocaliu din zonele C reunite a fost purificat prin cromatografiere repetată pe zahăr şi apoi cristalizat (λ max. 480,448 mμ, în spectrul IR bandă puternică la 1750 cm^{-1}, repartiţie epifazică în hexan-metanol 95%). Xantofila eliberată prin saponificare (IV) şi cristalizată are polaritatea relativă 2,23 (M_{50} = 73), λ max. 480,448 mμ, în spectrul IR benzi la 1030 şi 1052 cm^{-1}, p.t. 172°C [6].

Zona D. Hidroxiechinenonă (III a). Pigmentul din Zona C purificat pe coloană de MgO + nisip are în vizibil un singur maxim de absorbţie situat la 456 mμ (în hexan), iar după reducere cu KBH_4 în soluţie metanolică curba de absorbţie se schimbă, prezentînd două maxime (480 şi 448 mμ), caracteristice sistemului polienic al β-carotinei. Carotinoida eliberată în urma saponificării pigmentului din zona C are λ max. 460 mμ, polaritatea relativă 1,26 (M_{50} = 99) şi nu se elueză de pe coloaa de MgO decît cu adaus de CH_3COOH. Aceste proprietăţi corespund substanţei III *a*, respectiv III *b*.

Fracţiunea E. β-carotina (I). Fracţiunea E a fost saponificată cu KOH etanolic (4 h la 40°C), pigmentul deplasat în eter de petrol şi apoi cromatografiat pe MgO. Zona principală portocalie are λ max. 480, 448 mμ, repartiţie epifazică şi formează zonă unitară în cromatogramă de amestec cu β-carotină autentică.

Semisinteza 3,4-dihidroxi-β-carotinei (II) şi a 3,3', 4'-trihidroxi-4-ceto-β-carotinei (IV a). Pigmenţii III *a* şi VI *a*, sub forma esterilor naturali, dizolvaţi în etanol 95%, au fost reduşi cu KBH_4, mersul reacţiei fiind urmărit spectroscopic (apariţia a două maxime de absorbţie la 480 şi 448 mμ). Produşii de reacţie au fost deplasaţi în eter de petrol şi cromatografiaţi. Prin reducerea esterului de III *a* a rezultat un singur produs de reacţie, prin a cărui saponificare a rezultat II (M_{50} = 92, polaritatea relativă 1,5). Cromatograma produşilor de reacţie rezultaţi prin reducerea esterului de VI *a* prezintă, pe lîngă produsul principal de reducere IV [6], şi o mică cantitate din compusul V *a* (ester), care are λ max. 456 mμ şi în spectrul IR atît bandă pentru carbonil la 1627 cm^{-1} cît şi pentru hidroxil la 1040 cm^{-1}. Prin saponificare se transformă în V b, λ max. 460 mμ, polaritate relativă 2,48 (M_{50} = 68), în spectrul IR benzi la 1028, 1040, 1070, 1630 cm^{-1}.

Analiza cromatografică a pigmenţilor din sacii ovigeri de *A. Salinus.* 200 g saci ovigeri conservaţi în metanol au fost prelucraţi ca mai sus, după o prealabilă zdrobire cu nisip. Cromatograma a prezentat aceleaşi zone ca şi la prelucrarea materialului biologic integral. Pentru a verifica identitatea pigmenţilor s-au executat cromatograme de amestec cu pigmenţii din zonele B, respectiv C.

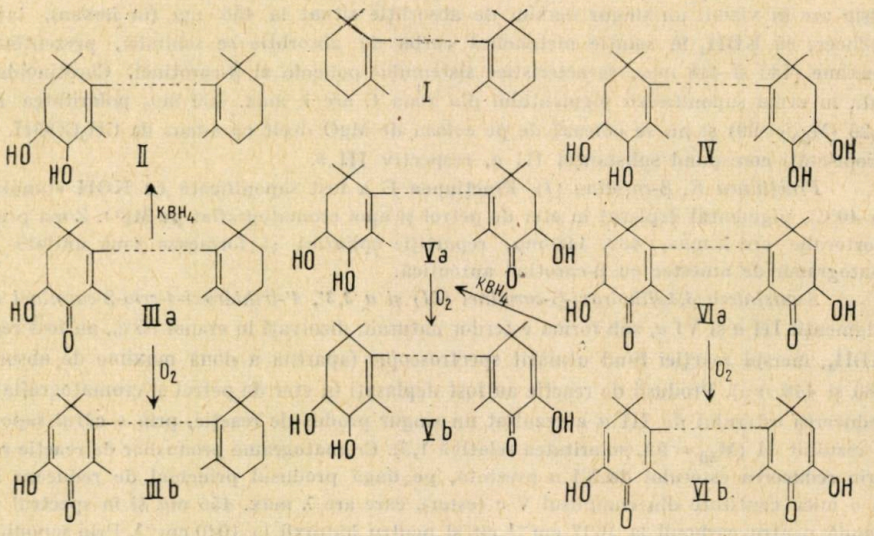
Dozarea pigmenţilor din *A. salinus.* O cantitate de circa 50 g material biologic păstrat în metanol a fost zdrobită cu nisip şi apoi extrasă cu acetonă. Pigmenţii din extractele acetonice împreună cu cei din primul extract metanolic au fost deplasaţi în eter de petrol. O cotă parte din extractul în eter de petrol a fost cromatografiat pe MgO : praf de sticlă cu granulaţie 0,2 mm (1 : 4) şi developat cu eter de petrol la care s-a adăugat 1—5% acetonă, iar diferiţii pigmenţi au fost eluaţi în acetonă. Dozarea s-a făcut fotocolorimetric, folosind ca standard astacină, crustaxantină şi β-carotină cristalizate.

Determinarea substanţei uscate s-a făcut, atît la materialul biologic conservat cît şi la extractul metanolic, prin uscare 4 h la 60°C şi apoi 1 h la 105°C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Separarea cromatografică a pigmenţilor extraşi din *Arctodiaptomus salinus* proaspăt colectat a scos în evidenţă prezenţa pe lîngă astaxantină şi β-carotină a unor carotinoide secundare.

Astaxantina (VI *a*), carotinoidă caracteristică crustaceelor [7], se găseşte sub formă de ester. La hidroliză, astaxantina se transformă prin autoxidare în astacină (VI *b*), carotinoidă cu structură ceto-enolică. În cromatogramele extractelor obţinute din materialul biologic uscat sau din materialul păstrat cîteva zile în metanol, apar mici cantităţi de astacină formate în



Schema I

urma unei hidrolize parţiale a esterului. Zona corespunzătoare esterului de astaxantină nu este unitară, deoarece pe lîngă izomerul *trans* total apar şi izomeri *cis*.

Identificarea astaxantinei s-a făcut pe baza spectrelor de absorbţie în vizibil şi IR ale pigmentului înainte şi după saponificare, a proprietăţilor acide ale produsului de hidroliză caracteristice structurii ceto-enolice a astacinei şi a fost confirmată prin cromatogramă de amestec cu astaxantină izolată din *Astacus fluviatilis* şi din flori de *Adonis aestivalis* [8]. Pentru identificarea izomerilor *cis* s-a recurs şi la proba de izomerizare în forma *trans* totală.

În cromatograma extractelor nesaponificate β-carotina nu este reţinută datorită conţinutului ridicat în lipide a materialului analizat (23,6% lipide în material uscat).

Dintre carotinoidele secundare două se găsesc în cantitate ceva mai mare, care a permis stabilirea structurii lor. Una s-a dovedit a fi o carotinoidă cunoscută şi anume hidroxiechinenona (III), iar cealaltă este o nouă xantofilă, superior hidroxilată. Ambele apar sub formă de esteri.

Hidroxiechinenona a fost găsită pentru prima dată de către N. I. Krinsky şi T. H. Goldsmith în extracte de *Euglena gracilis* [9]. Proprietăţile descrise de autorii care au dus la stabilirea structurii hidroxiechinenonei au fost regăsite de noi. Prin reducerea esterului hidroxiechinenonei cu KBH_4, urmată de saponificare, s-a obţinut *3*, *4*-dihidroxi-β-carotina

(II), a cărui coeficient de repartiție M_{50}, stabilit după metoda Krinsky [10], corespunde polarității relative 1,5 ($M_{50} = 92$).

Structura celei de a doua carotinoidă secundară, care este o nouă xantofilă pentru care propunem numele de „crustaxantină", s-a dovedit a fi *3*, *4*, *3'*, *4'*-tetrahidroxi-β-carotină (IV), după cum este arătat într-o

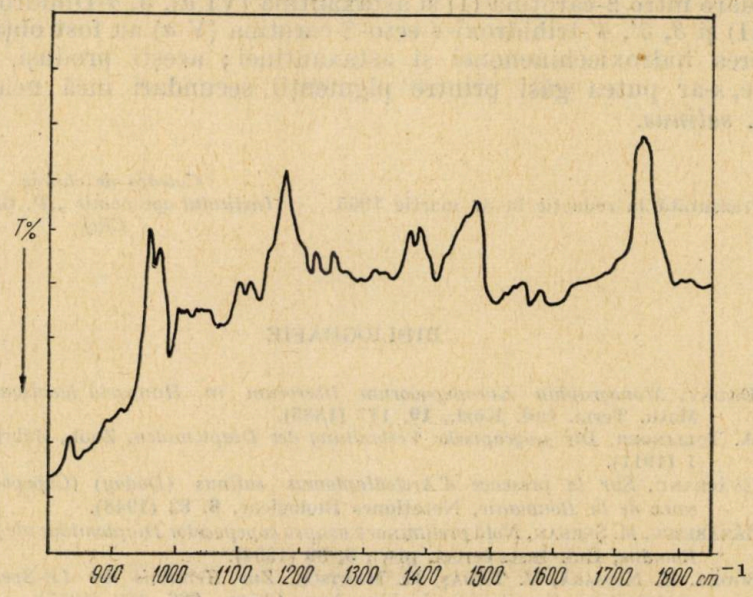


Fig. 1

altă comunicare [6]. Crustaxantina se găsește în *A. salinus* sub formă de tetraester al unui acid gras superior încă neidentificat, după cum rezultă din spectrul IR (fig. 1).

Pentru a avea certitudinea că crustaxantina este un pigment care aparține copepodei studiată și nu provine din resturi de hrană, am analizat pigmenții din sacii ovigeri, a căror puritate a putut fi controlată microscopic. Cromatograma obținută din extractele de saci ovigeri nu se deosebește calitativ de cea a extractelor materialului biologic integral. Experiențe preliminare indică existența crustaxantinei și la alte crustacee.

Studiul cantitativ al pigmenților carotinoidici din *A. salinus* s-a făcut pe două probe, una colectată primăvara (luna mai) și alta toamna (luna octombrie). După cum rezultă din datele cuprinse în tabela nr. 1,

Tabela nr. 1

Conținutul în pigmenți carotinoidici (în mg/100 g material uscat)

Pigmentul	Din probe recoltate	
	Primăvara	Toamna
Astaxantină	251,3	263,1
Crustaxantină	22,1	22,2
Hirdoxiechinenonă*	2,6	3,1
β-Carotină	0,9	1,1

* Determinată prin comparare cu astaxantină.

conţinutul în pigmenţi nu diferă decît puţin în cele două probe analizate.

Între astaxantină şi carotinoidele secundare identificate se observă o strînsă corelaţie biochimică, hidroxiechinenona (III *a*) şi crustaxantina (IV) constituind după cum se vede din schemă compuşi cu grade diferite de oxidare între β-carotină (I) şi astaxantină (VI *a*). *3*, *4*-Dihidroxi-β-carotina (II) şi *3*, *3'*, *4'*-trihidroxi-*4*-ceto-β-carotina (V *a*) au fost obţinute prin reducerea hidroxiechinenonei şi astaxantinei; aceşti produşi, preparaţi sintetic, s-ar putea găsi printre pigmenţii secundari încă neidentificaţi din *A. salinus*.

Prezentată la redacţie la 31 martie 1965

Catedra de chimie
Institutul agronomic „P. Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. E. Daday, *Monographia Eucopepodorum liberorum in Hungaria hucusque repertorum* Math. Term. tud. Közl., **19**, 117 (1885).
2. M. A. Tollinger, *Die geograpische Verbreitung der Diaptomiden*, Zool., Jahrb. Syst., **30**, 1 (1911).
3. V. Enăceanu, *Sur la presence d'Arctodiaptomus salinus (Daday) (Copepode) dans les eaux de la Roumanie*, Notationes Biologicae, **6**, 83 (1948).
4. P. Bănărescu, M. Şerban, *Notă preliminară asupra copepodelor Diaptomidae ale faunei Române*, Bul. Inst. cercet. pisc., **3**, 39 (1954).
5. C. Bodea, E. Nicoară, V. Tămaş, H. Mantsch, *Zur Kenntnis der IR-Spektren Sauerstoff-halliger Carotinoide*, Liebigs Ann. Chem., **666**, 189 (1963).
6. C. Bodea, E. Nicoară, Gh. Illyes, M. Şuteu, *Structura crustaxantinei*, Rev. roum. Chim., 1965.
7. E. Lederer, *Les caroténoïdes des animaux*, Hermann et Cie, Paris, 1935, p. 28.
   L. R. Fisher, S. K. Kon, S. Y. Thompson, *Vitamin A and Carotenoids, in certain Invertebrates. I. Marine Crustacea*, J. Mar. Biol., Assoc., **31**, 229 (1952).
8. A. Seybold, *The color changes in the flowers, fruits and seedcoats*, Sitzber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-Naturw. Kl., *4*, (1953).
   A. Seybold, T. W. Goodwin, *Occurrence of Astaxanthin in the Flower Petals of Adonis annua L.*, Nature, **184**, 1714 (1959).
9. N. I. Krinsky, T. H. Goldsmith, *The Carotenoids of the Flagellated Alga, Euglena gracilis*, Arch. Biochem. Biophys., **91**, 271 (1960).
10. N. I. Krinsky, *A Relationship between Partition Coefficients of Carotenoids and Their Functional Groups*, Analyt. Biochem., **6**, 293 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 277–281 (1965)

DINAMICA VALORILOR VITAMINEI C ÎN FUNCȚIE DE VÎRSTĂ ȘI SUB ACȚIUNEA TRATAMENTULUI CU CISTEINĂ ȘI FOLCISTEINĂ OERIU *

S. OERIU MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R. S. ROMÂNIA și GEORGETA ORGHIDAN

612.392.01 : 577.71

Rezumat. — Concentrația vitaminei C din sînge la animale (șobolani și iepuri) și la oameni, scade cu vîrsta.

La șobolanii bătrîni, în urma tratamentului cu cisteină, valorile vitaminei C din sînge cresc apropiindu-se de valorile animalelor adulte. La iepurii și la oamenii bătrîni tratați cu folcisteină, concentrația vitaminei C din sînge crește; valorile se apropie de ale organismelor adulte.

În cercetările noastre anterioare s-au evidențiat multiple aspecte ale procesului de îmbătrînire [1–8].

Cercetările privind concentrația unor vitamine au arătat că valorile vitaminelor PP, B_1, B_2 din sînge și ale vitaminelor B_6, B_{12}, acid folic și acid pantotenic din serul sanguin sînt scăzute la șobolanii bătrîni față de cele ale animalelor tinere și că tratamentul cu cisteină influențează valorile celor dintîi în sensul celor proprii organismului mai tînăr [9].

Cum modificările echilibrului unora din vitaminele studiate se repercută asupra proceselor de oxido-reducere și dat fiind rolul vitaminei C în procesele de oxido-reducere, ne-am propus în lucrarea de față completarea acestor date cu studiul eventualelor modificări de concentrație ale vitaminei C din sînge, în funcție de vîrsta organismului și sub acțiunea cisteinei și folcisteinei, care pun în libertate pe cale enzimatică, în organism, gruparea —SH.

MATERIAL ȘI METODA DE LUCRU

Cercetările s-au făcut pe animale (șobolani și iepuri) și oameni de diferite vîrste.

Șobolanii au fost grupați în cinci loturi egale: șobolani tineri (în vîrstă de 2–3 luni), adulți (12 luni), bătrîni (24 luni), șobolani bătrîni tratați cu cisteină și șobolani bătrîni tratați cu folcisteină.

* Lucrare publicată în Rev. Roum. Biochim., 2, 3 (1965), în limba germană.

Iepurii au fost împărţiţi în patru loturi egale : iepuri tineri (2—3 luni), adulţi (10—12 luni), bătrîni (18—24 luni) şi iepuri bătrîni trataţi cu folcisteină.

Animalelor li s-a administrat timp de 21 de zile cisteină 0,03 g/kg corp) sau folcisteină (0,03 g/kg corp) ; administrarea s-a făcut zilnic, intramuscular.

Dozarea vitaminei C s-a făcut după metoda Roe şi Knether [10], modificată de Lloyd şi colab. [11].

REZULTATE

Rezultatele sînt cuprinse în tabelele nr. 1 şi 2.

La oameni cercetările au fost făcute şi ele în funcţie de vîrstă. În acest scop s-au folosit pentru stabilirea valorilor medii ale vitaminei C

Tabela nr. 1

Valorile medii ale vitamiei C (în mg/100 ml singe total) la şobolani de diferite vîrste ; la cei bătrîni şi sub acţiunea cisteinei, respectiv a folcisteinei

Nr. crt.	Şobolani			Şobolani bătrîni trataţi cu cisteină	Şobolani bătrîni trataţi cu folcisteină
	tineri	adulţi	bătrîni		
1	0,60	0,54	0,36	0,54	1,20
2	0,78	0,36	0,47	0,36	1,64
3	1,32	0,60	0,27	0,73	1,27
4	0,78	0,36	0,27	0,64	0,93
5	1,09	0,36	0,90	0,90	1,45
6	1,02	0,54	0,27	0,60	1,20
7	1,02	0,54	0,36	0,36	0,90
8	0,65	0,78	0,47	0,64	1,20
9	0,78	0,27	0,27	0,90	0,90
10	0,36	0,78	0,36	0,27	0,36
Media	0,84	0,51	0,40	0,59	0,90
Eroarea standard	±0,09	±0,055	±0,06	±0,07	±0,13
P	<0,01	>0,01		<0,1	<0,01

din sînge, în funcţie de vîrstă, patru loturi de cîte 10 oameni, între 4 şi 10, 20, 40 şi 60 de ani.

Rezultatele sînt redate în tabela nr. 3.

În a doua etapă s-a folosit un lot de 8 oameni între 62 şi 73 de ani, cărora li s-au făcut determinările de vitamină C înainte şi după 6 şi 12 luni de la începerea tratamentului cu folcisteină. În primele 4 luni s-a administrat folcisteina (250 mg în fiole de 5 ml) o dată la două zile, iar în următoarele 8 luni o dată la trei zile. În primele 6 luni s-a făcut o pauză de 10—14 zile după fiecare două luni de tratament ; între 6 şi 12 luni de tratament pauzele au fost mai mari (21 de zile).

Rezultatele acestor experienţe sînt redate în tabela nr. 4.

Tabela nr. 2

Valorile medii ale vitaminei C (în mg/100 ml sînge total) la iepuri de diferite vîrste, la animale bătrîne şi sub acţiunea tratamentului cu folcisteină

Nr. crt.	Iepuri tineri	Iepuri adulţi	Iepuri bătrîni	Iepuri bătrîni trataţi cu folcistein
1	1,81	1,62	0,78	1,38
2	2,18	1,50	0,41	0,78
3	2,60	1,50	0,36	1,09
4	2,36	1,70	0,41	0,54
5	2,60	2,14	0,36	1,09
6	2,05	1,32	0,36	0,78
7	2,42	2,18	0,78	2,54
8	1,81	1,50	0,78	1,38
9	2,00	1,58	0,78	1,38
10	2,18	1,27	0,36	0,78
Media	2,20	1,63	0,54	1,17
Eroarea standard	±0,093	±0,096	±0,066	±0,18
P	<0,01	<0,01		<0,01

Tabela nr. 3

Valorile medii ale vitaminei C (în mg/100 ml sînge total) la oameni de diferite vîrste

Nr. crt.	Copii (4—10 ani)	Adolsecenţi (20 de ani)	Adulţi (40 de ani)	Bătrîni normali
1	2,72	2,18	2,00	0,60
2	2,96	2,00	1,27	0,90
3	1,82	1,27	1,54	0,36
4	1,82	2,00	1,45	0,60
5	2,43	1,82	1,27	0,36
6	2,18	2,72	1,02	0,90
7	2,36	2,18	0,78	0,90
8	1,09	2,00	1,54	0,60
9	1,54	1,02	1,27	0,47
10	1,82	1,82	1,27	0,78
Media	2,07	1,90	1,34	0,65
Eroarea standard	±0,18	±0,15	±0,13	±0,07
P	<0,01	<0,01	<0,01	

Tabela nr. 4

Valorile medii ale vitaminei C (în mg/100 ml sînge total) la oameni de vîrstă înaintată

Nr. crt.	Vîrsta	Înainte de tratament	După tratament timp de	
			6 luni	12 luni
1	67	0,60	2,42	1,09
2	62	0,78	0,54	1,69
3	70	0,78	0,74	1,50
4	63	1,54	2,60	2,54
5	70	1,93	2,18	2,38
6	65	1,53	2,27	2,38
7	63	1,02	1,09	1,27
8	73	1,27	2,18	1,56
Media		1,18	1,75	1,80
P			< 0 01	< 0,01

CONCLUZII

1. Concentraţia vitaminei C din sîngele animalelor — şobolani şi iepuri — scade cu vîrsta. Această observaţie este valabilă şi la om.

2. Valorile vitaminei C din sîngele şobolanilor bătrîni trataţi cu cisteină se situează între cele ale animalelor adulte şi tinere; sub acţiunea folcisteinei, ele se situează în limitele observate la animalele tinere.

La iepurii bătrîni trataţi cu folcisteină-Oeriu, valorile vitaminei C se situează între cele ale animalelor bătrîne şi adulte.

Sub acţiunea administrării de folcisteină-Oeriu la oameni de vîrstă înaintată (62—73 de ani) concentraţia vitaminei C se modifică în sensul celei observate la oameni mai tineri (20—40 de ani).

Prezentată la redacţie la 27 martie 1965

Catedra de chimie biologică II, I.M.F., Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. S. Oeriu, *Contribuţii la relaţia dintre tioaminoacizi în organismul animal şi vegetal*, St. cerc. Biochim., **I**, *4*, 321—328 (1958).
2. S. Oeriu, *Cysteine and Free Amonia in the Brain Tissue of Old Organism*, Bull. de l'Acad. polon. des Sciences, serie Sc. Biologique, **X**, *12*, 521—524 (1962).
3. S. Oeriu, *Dannie k poznaniu biochimiceskogo mehanizma proţesa starenia i k deistviu nekotorîh sovistvennîh organizm vescestvo na vostanavlenie narusennogo biochimiceskogo ravnovesia u starovo jivotnogo*, Uspehi Sov. biologhii, **54**, *2* (*5*), 248—264, (1962).
4. S. Oeriu, *Biochemical Aspects of Ageing Processes in the Central Nervous Cystein Synthesis*, Chemotherapia (Basel), **5**, 349—361 (1962).
5. S. Oeriu, *Issledovanie otnoşenia mejdu vitaminami coenzimamii i sootvetstveninscimi fermentami i zavisimosti ot vozrasti jivotnogo, pod deistviem nekotorîh vescestv svoistvennîh organizm*, Biohimia, **28**, *1*, 3—8 (1963).

6. S. Oeriu, I. Tănase, *Aspetti biochimici del processo d'invechiamento nel sistema nervoso centrale. Nota III. L'azione della cisteina e della vitamine di metilazione e metabolizzatione dello zolfo sugli aminoacidi del talamus di ratto, in animali di eta differente*, Giorn. di Geront., **X**, 867—886 (1962).
7. S. Oeriu, I. Tănase, *Aspecte biochimice ale procesului de îmbătrînire în sistemul nervos central. V. Rolul cisteinei și al vitaminelor de metilare și de metabolizare a sulfului în metabolismul aminoacizilor din substanța cenușie a cerebelului la șobolani de diferite vîrste*, Com. Acad. R.P.R., **XIII**, *2*, 145—162 (1963).
8. S. Oeriu, M. Tigheciu, *Biochemie der biologischen Alternsprozesse. III. Der Blut Glutathionspiegel bei Tieren verschiedenen Alters und der Einfluss von verabreichten Cystein, Vitamin B_6, Vitamin B_{12} und Folsäure auf die Glutathion-Werte der alten Tiere*, Zeitschr. für Alternsforschung, **15**, *4*, 314—317 (1962).
9. S. Oeriu, Șt. Ionescu, *Biochimia în biologia vîrstelor. Tulburări în metabolizarea vitaminelor, una din funcțiile procesului de îmbătrînire*, Com. Acad. R.P.R., **XI**, *5*, 529—533 (1961).
10. J. H. Roe, A. Knther, *The determination of ascorbic acid in the whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehidroascorbic acid*, J. Biol. Chem., **147**, 399 (1943).
11. B. B. Lloyd, H. M. Sinclair, G. .R. Webster, *Estimation of ascorbic acid for clinicall purposes by hydrazine method*, Biochem. J., **XVII**, 49 (1945).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 283–291 (1965)

HORMONII 17-CETOSTEROIZI ŞI FENOL-STEROIZI ÎN FUNCŢIE DE VÎRSTĂ ŞI TRATAMENT CU SUBSTANŢE EMIŢĂTOARE DE GRUPĂRI -SH LA OAMENI *

S. OERIU, MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R. S. ROMÂNIA, V. COJOCARU, T. SPANDONIDE, VIORICA APOSTOL şi LUCIA CIURTIN

612.61/63.018 : 577.71

Rezumat. — Studiul acestor hormoni urinari în funcţie de vîrstă, la om, scoate în evidenţă diminuarea valorilor *17*-cetosteroizilor neutri totali la ambele sexe, de vîrstă înaintată, precum şi a fracţiunilor IV şi V cromatografice ale hormonilor de origine gonadică şi creşterea fracţiunilor VI şi VII cromatografice ale hormonilor de origine corticosuprarenală.

Fenol-steroizii totali urinari rămîn la bărbaţi în limitele valorilor observate la adulţi; la femei, ele scad sub valorile premergătoare menopauzei.

Sub acţiunea folcisteinei (substanţă generatoare în organism pe cale enzimatică de grupări -SH), la bărbaţi cresc valorile fracţiunii IV cromatografice, reprezentată de androsteronă (de origine predominant gonadică), cu acţiune anabolizantă. Cresc de asemenea şi fenol-steroizii totali urinari, la femei.

Xilocaina folosită drept „placebo" duce, la bărbaţi, la tulburări în echilibrul hormonilor androgeni, prin accentuarea proceselor de degradare ale hormonilor glicocorticoizi (cortizonul şi cortizolul).

Asupra fenol-steroizilor nu exercită o acţiune semnificativă statistic.

Una dintre problemele mari ale fiziologiei şi biochimiei contemporane, care stă în centrul preocupărilor multor oameni de ştiinţă, este studiul modificărilor morfologice, fiziologice şi biochimice care au loc în procesele biologice de îmbătrînire, precum şi studiul influenţei unor factori endogeni şi exogeni care ar putea preveni sau întîrzia îmbătrînirea.

Lucrările din ultimul timp, privind biochimia proceselor de îmbătrînire, evidenţiază tulburări la nivel molecular, caracterizate printr-o acumulare de grupări disulfidice (creşterea valorilor cistinei şi ale glutationului oxidat) şi tulburări în activitatea enzimatică —SH, cu repercusiuni asupra echilibrului biochimic [5—8], [10—13], [15—17]. Tulburările în activitatea glutaminazei (enzimă —SH) din creier micşorează valoarea

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **2**, *3* (1965) în limba engleză.

glutaminei şi creşte pe acea a amoniacului liber [9]. Tulburările din activitatea enzimatică din ţesuturi duc la un dezechilibru în raportul vitaminelor-coenzime cu rol în procesele de oxidoreducere [14].

În lucrările privind acţiunea substanţelor cu grupări —SH asupra echilibrului biochimic tulburat la animalele bătrîne, Oeriu (1961) a reuşit să evidenţieze în procesul de restabilire a acestui echilibru acţiunea însemnată a cisteinei, substanţă —SH, şi a folcisteinei, care pe cale enzimatică pune în libertate gruparea —SH reactivă a formil-cisteinei.

Pornind de la relaţia dintre vitamine, enzime şi hormoni, ne-am propus studiul eventualelor modificări în activitatea unor hormoni, în funcţie de vîrstă şi sub acţiunea folcisteinei, asupra echilibrului biochimic tulburat în organismul bătrîn.

În lucrarea de faţă prezentăm studiul modificărilor concentraţiilor *17*-cetosteroizi (17-CS) neutri totali urinari şi ale fracţiunilor lor cromatografice, la două grupări de oameni de vîrstă înaintată; unul dintre ele a fost supus unui tratament cu folcisteină, iar al doilea a fost tratat cu xilocaină, ca „placebo". S-a ales xilocaina ca „placebo" pentru că în produsul de folcisteină administrat se găseşte xilocaină ca anestezic. Prezentăm de asemenea valorile fenol-steroizilor urinari totali, la oameni de diferite vîrste, înainte şi după tratamentul cu folcisteină, respectiv xilocaină.

METODA ŞI MATERIALUL DE LUCRU

La un număr de 85 de oameni, între 50 şi 80 de ani, s-au determinat 17-CS neutri totali din 24 de ore: la 20 din ei s-au făcut şi determinări cromatografice ale fracţiunilor 17-CS, înainte şi după 6 luni de tratament cu folcisteină, iar la alţi 16 înainte şi după tratament cu xilocaină.

Pentru studiul fenol-steroizilor totali urinari s-a folosit un grup de 122 de oameni între 50 şi 80 ani (66 bărbaţi şi 56 femei), împărţiţi pe două loturi: un lot de 89 de oameni (49 bărbaţi şi 40 femei) reprezintă martorii netrataţi; al doilea lot, constituit din 33 oameni (17 bărbaţi şi 16 femei), subîmpărţit pe două grupe, a fost supus tratamentului. Una din aceste două grupe, formată din 9 femei şi 7 bărbaţi, a fost tratată cu folcisteină, iar a doua, formată din 9 bărbaţi şi 8 femei, a fost supusă tratamentului cu xilocaină.

Pentru determinarea 17-CS neutri totali urinari s-a folosit metoda Cahen-Salter (coloraţie Zimmerman) [1—3]; pentru fracţiunea acestora, micrometoda cromatografică pe coloană, descrisă de Pond [18].

Extragerea fenol-steroizilor totali urinari din urină de 24 de ore s-a făcut prin metoda Jayle şi Crepy [4].

Tratamentul cu folcisteină (250 mg, în fiole de 5 ml) s-a administrat i.m. profund în fesă, timp de 3 luni, o dată la 2 zile, după care s-a făcut o pauză de 14 zile. S-a reluat tratamentul încă alte 3 luni, timp în care injecţiile s-au administrat o dată la 3 zile. În aceleaşi condiţii de lucru şi de timp s-a aplicat xilocaina, în doza folosită ca anestezic (20 mg xilocaină în fiole de 5 ml ser fiziologic).

REZULTATE

A. Valorile medii ale 17-CS neutri totali urinari din 24 de ore, exprimate în mg, la 85 de oameni între 50 și 80 de ani netratați sînt cuprinse în tabela nr. 1 și se suprapun limitelor cunoscute în literatură.

Tabela nr. 1

Valorile medii ale 17-cetosteroizilor neutri totali urinari (mg/24 de ore) la oameni în vîrstă

Vîrsta (ani)	Nr. de cazuri	Bărbați (valori medii)	Erori standard (±)	Femei (valori medii)	Nr. de cazuri	Erori standard (±)
50—60	13	3,7	0,5	2,4	9	0,4
61—70	21	2,7	0,2	2,3	17	0,5
71—80	13	2,1	0,3	2,2	12	0,4

Valorile 17-CS neutri totali și fracționați, obținute la 20 de oameni (11 femei + 9 bărbați) în vîrstă de 53—74 ani, înainte și după un tratament timp de 6 luni cu folcisteină, sînt cuprinse în tabela nr. 2, iar cele privind lotul tratat cu „placebo", constituit din 17 oameni (8 femei + 9 bărbați) tratați cu xilocaină, se găsesc în tabela nr. 3.

Dintre modificările produse sub acțiunea tratamentului cu folcisteină, este de reținut că fracțiunea IV (reprezentînd androgenii de origine predominant gonadică — grupa anabolic) crește la bărbați ($P < 0,01$).

Sub acțiunea tratamentului cu xilocaină se observă, față de valorile crescute la bărbații netratați, o creștere în continuare, semnificativă ($P < 0,02$), a fracțiunilor VI + VII ale hormonilor glicocorticoizi cataboliți ai cortizonului și cortizolului, de origine cortico-suprarenală.

B. Valorile medii ale excreției urinare de fenolsteroizi totali, exprimate în gama / 24 de ore la oameni între 50 și 80 de ani, înainte și după tratamentul cu folcisteină sau xilocaină, sînt cuprinse în tabela nr. 4.

Valorile medii ale fenol-steroizilor urinari, găsite de noi la bărbați pe 9 cazuri (34,9 gama / 24 de ore) se suprapun celor redate în materialul bibliografic. La femei, media valorilor obținute de noi pe 9 cazuri este de 25,8 gama / 24 de ore, față de valorile obținute la femeile în menopauză (între 14 și 24 gama / 24 de ore) [2].

Administrarea de folcisteină timp de 6 luni unui lot de 9 femei și 9 bărbați între 50 și 80 ani determină la femei o creștere a mediei valorilor excreției fenol-steroizilor urinari totali ($P = 0,05$), față de valorile observate înainte de tratament.

Sub acțiunea administrării de xilocaină, în aceeași perioadă de timp și în aceleași condiții de lucru, la loturile constituite din 8 bărbați și 7 femei, modificările valorilor medii ale fenol-steroizilor nu sînt statistic semnificative.

Tabela

Valorile 17-cetosteroizilor neutri totali urinari (mg/24 de ore) şi ale fracţiilor cromatografice (procente

Sex	Nr.	Numele	Vîrsta (ani)	Fracţiuni cro-					
				I		II + III		IV	
				Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.
Bărbaţi	1	D.I.	72	12,7	10,2	12,5	11,1	4,9	8,4
	2	C.L.	67	7,0	4,4	28,2	10,9	2,0	7,9
	3	D.V.	74	31,0	16,9	24,2	11,6	8,1	9,2
	4	G.M.	66	22,0	5,4	9,5	6,5	2,0	7,9
	5	D.G.	62	15,2	17,8	17,1	16,7	9,5	15,0
	6	M.A.	72	12,0	14,1	16,0	21,9	16,1	32,0
	7	C.I.	61	11,2	8,1	9,5	2,6	5,3	9,6
	8	M.I.	71	10,0	13,0	11,5	14,6	3,6	9,9
	9	J.P.	61	9,0	7,0	9,4	18,1	7,4	29,8
Valoarea medie a diferenţei				3,6		2,6		7,9	
P				>0,1		>0,1		<0,01	
Femei	1	P.A.	56	25,1	5,0	19,1	10,8	6,9	19,0
	2	C.I.	74	15,3	11,1	14,0	9,3	10,6	9,4
	3	C.I.	53	18,1	17,4	14,7	6,5	8,2	1,8
	4	F.P.	58	24,0	22,0	18,1	21,1	18,0	17,8
	5	C.A.	65	11,0	15,0	21,4	19,7	12,8	18,6
	6	N.G.	70	19.3	30,0	16,6	27,0	18,1	13,4
	7	M.M.	72	13,3	22,2	16,2	17,3	12,5	16,2
	8	R.T.	72	5,0	11,0	4,0	15,5	5,6	8,0
	9	A.S.	54	12,6	13,2	11,7	21,0	8,5	12,5
	10	Z.M.	56	11,0	12,5	6,8	14,8	8,4	24,3
	11	M.L.	62	11,0	11,7	7,3	24,6	7,2	20,9
Valoarea medie a diferenţei				0,5		3,4		4,1	
P				>0,5		>0,1		>0,1	

DISCUŢII

A. Studiul cromatografic al 17-CS neutri totali scoate în evidenţă, pentru oamenii în vîrstă, de ambele sexe, o diferenţiere între cele două mari grupe de 17-CS, de provenienţă gonadică sau corticosuprarenală, a căror relaţie dintre activitatea biologică şi structura chimică a fost stabilită de Albeaux, Fernet şi Bellot (1954—1957).

La oamenii de vîrstă înaintată scad fracţiunile IV şi V care reprezintă hormonii androgeno-protidici ai gonadelor (grup anabolic), şi cresc fracţiunile VI şi VII, cataboliţi ai glicocorticoizilor de origine corticosuprarenală. Scăderea valorilor fracţiunii IV la oamenii în vîrstă indică diminuarea activităţii gonadelor în procesul de îmbătrînire.

După instituirea tratamentului cu folcisteină are loc, la bărbaţi, o creştere a fracţiunii IV ($P < 0,01$), fapt care modifică raportul A/E (androsteronă / etiocolanolonă) în sensul apropierii valorilor acestora de cele normale pentru adulţi.

nr. 2

față de totalul lor) la oameni în vîrstă, înainte și după un tratament timp de 6 luni cu folcisteină

matografice

V		VI + VII		VIII		Total 17-CS	
Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.
12,4	9,1	56,2	42,2	0,2	18,2	1,4	1,3
6,0	7,9	55,8	48,0	1,1	19,0	0,8	1,8
8,0	4,6	23,4	33,2	5,2	23,7	1,8	1,8
3,5	6,6	52,1	50,2	11,0	23,0	2,9	3,9
13,9	11,3	22,6	24,2	21,7	15,0	4,1	1,2
18,9	7,3	27,6	12,0	3,6	12,7	3,2	2,6
5,6	23,1	26,8	52,2	41,6	3,7	2,6	1,6
3,8	20,6	62,1	22,9	21,1	18,5	2,7	2,1
3,6	8,8	51,0	20,2	20,0	15,6	2,5	2,0
2,6 >0,1		8,0 >0,1		2,6 >0,5		0,4 >0,1	
9,8	11,0	16,6	44,5	22,3	8,9	1,7	0,8
15,0	4,1	18,4	44,4	28,0	17,0	0,9	1,2
10,2	6,4	44,1	50,7	4,3	19,0	2,4	2,2
11,8	11,6	18,1	13,1	10,0	14,5	1,8	0,7
14,8	15,2	22,8	17,6	17,2	13,8	1,1	1,4
11,4	6,0	22,3	11,0	12,3	12,0	2,8	1,5
12,0	24,2	25,9	13,0	20,1	7,1	2,2	1,1
10,0	14,0	44,9	28,3	30,5	22,7	2,4	1,0
9,8	12,7	41,5	19,8	15,9	20,8	0,9	1,1
5,9	14,2	47,1	20,0	20,8	14,2	2,0	1,4
11,1	8,7	42,3	19,3	21,3	14,8	1,1	1,6
1,4 >0,5		5,9 >0,1		2,1 >0,1		0,48 >0,05	

Modificarea subliniată este în concordanță și cu modificările clinice, pe plan funcțional.

În schimb, sub acțiunea xilocainei, apare la bărbați o creștere a fracțiunilor VI + VII ($P < 0,02$), de unde reiese că în aceste condiții are loc o accentuare a proceselor de degradare a hormonilor glicocorticoizi, cortizonul și cortizolul.

B. Creșterea valorilor estrogenilor de excreție la femeile de vîrstă înaintată, sub acțiunea tratamentului cu folcisteină, corelată cu valorile scăzute ale gonado-stimulinelor hipofizare urinare, pare să provină din stimularea funcțională a ovarelor pe cale hipofizară. Acest fapt prezintă interes, știind că hormonilor estrogeni le revine un rol complex în procesele metabolice la bătrîni și că tulburări produse în echilibrul acestora, influențează osteoporoza, ateroscleroza etc.

Tabela

Valorile 17-cetosteroizilor neutri totali urinari (mg/24 de ore) şi ale fracţiilor cromatografice (pro-

Sex	Nr.	Numele	Vîrsta (ani)	Fracţiuni cro-					
				I		II + III		IV	
				Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.
Bărbaţi	1	G.P.	70	23,3	12,6	4,5	6,2	2,3	5,0
	2	D.N.	76	13,2	19,0	11,9	4,9	0	6,2
	3	G.I.	75	3,1	10,8	82,6	6,5	4,4	8,4
	4	B.N.	72	8,0	12,6	48,5	8,6	8,5	3,5
	5	P.V.	67	14,0	2,8	8,5	11,1	12,0	11,4
	6	A.N.	75	14,3	6,3	16,9	3,4	14,3	3,9
	7	E.E.	57	15,0	8,3	9,8	9,2	12,0	18,8
	8	E.N.	53	10,2	8,1	16,6	10,4	4,5	9,8
Valoarea medie a diferenţei				3,8		17,3		1,1	
P				>0,1		>0,1		>0,5	
Femei	1	F.M.	75	13,8	2,1	63,9	1,8	4,7	0
	2	N.M.	75	7,2	15,5	50,8	16,2	7,8	1,5
	3	G.D.	75	7,61	20,2	27,8	6,1	10,8	5,1
	4	E.M.	64	0	7,5	62,7	8,0	0	4,1
	5	D.A.	60	17,5	9,8	10,6	22,6	8,4	20,0
	6	N.D.	63	16,4	2,8	15,0	16,9	11,0	20,0
	7	C.M.	70	15,1	8,3	20,5	18,3	14,0	23,0
	8	M.V.	55	4,2	8,0	4,1	22,2	6,0	18,9
Valoarea medie a diferenţei				0,9		18,4		3,7	
P				>0,5		>0,1		>0,1	

Dacă la aceste date se adaugă observaţiile experimentale privind secreţia excesivă de gonadotropine hipofizare în gonadectomii sau în menopauză, însoţită de încetarea secreţiei de estrogeni, şi dacă reţinem că administrarea de estrogeni împiedică hiperactivitatea compensatoare a hipofizei, apare util de semnalat că folcisteina, prin gruparea ei—SH pusă enzimatic în libertate, joacă un rol în menţinerea echilibrului biochimic hormonal.

CONCLUZII

1. La oameni de vîrstă înaintată (50—80 de ani) se produc modificări în relaţiile unor hormoni androgeno-protidici de natură gonadică şi cei de origine cortico-suprarenală din grupa 17-cetosteroizilor.

Fenol-steroizii totali urinari se păstrează la bărbaţi în limitele valorilor observate la adulţi; la femei, scad la valorile premergătoare menopauzei.

2. Sub acţiunea folcisteinei cresc la bărbaţi valorile fracţiunii IV cromatografice ($P < 0,01$), reprezentată de androsterona predominant gonadică, cu acţiune anabolizantă. Cresc de asemenea şi fenol-steroizii urinari, la femei.

nr. 3

cente față de totalul lor) la oameni în vîrstă, înainte și după tratament timp de 6 luni cu xilocaină

matografice						Total 17-CS (mg/24 de ore)	
V		VI + VII		VIII			
Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.	Înainte de trat.	După trat.
6,2	6,5	29,5	48,9	34,1	19,0	0,9	2,9
8,0	1,8	46,0	64,2	21,0	13,0	2,7	2,3
3,8	5,4	4,8	56,7	1,0	11,9	1,7	2,1
5,7	4,3	12,8	47,1	16,0	23,0	2,2	1,5
16,0	14,9	24,1	33,3	26,0	28,0	3,0	0,8
13,4	2,1	27,8	64,6	20,8	19,0	2,8	3,2
16,0	14,5	31,7	38,5	15,8	10,3	5,3	2,7
20,0	24,8	39,0	32,7	10,1	14,0	2,6	2,7
1,8 >0,1		21,3 <0,02		0,82 >0,5		0,37 >0,5	
2,4	0	6,8	53,8	7,8	45,0	1,4	1,5
7,5	6,9	10,9	42,2	15,4	17,2	1,4	2,2
10,5	11,1	18,0	34,3	23,0	22,8	0,6	1,3
9,8	3,5	22,5	36,2	3,8	40,6	0,5	0,8
9,0	10,0	42,0	21,2	14,8	14,8	4,3	2,4
9,8	15,0	32,0	22,4	16,0	21,0	4,6	2,5
6,6	16,0	22,4	21,0	21,0	13,0	4,4	1,3
15,0	10,0	40,0	22,3	30,0	18,0	4,2	2,8
0,2 >0,5		7,4 >0,1		7,6 >0,1		0,8 >0,1	

3. Xilocaina folosită drept „placebo" duce la bărbați la tulburări în echilibrul hormonilor androgeni, prin accentuarea proceselor de degradare ($P < 0,02$) a hormonilor glicocorticoizi (cortizonul și cortizolul). Asupra fenol-steroizilor nu exercită o acțiune semnificativă statistic.

4. Rezultatele obținute explică interesul crescînd ce se aplică substanțelor cu grupări—SH proprii organismului, în scopul menținerii mai îndelungate a echilibrului biochimic și fiziologic la oamenii de vîrstă înaintată.

Prezentată la redacție la 27 martie 1965

Catedra de biochimie II
a Institutului medico-farmaceutic
București

Tabela nr. 4

Valorile fenol-steroizilor totali urinari (gama/24 de ore) la oameni în vîrstă între 50—80 de ani înainte şi după un tratament de 6 luni cu folcisteină şi xilocaină

Sex	Lot de control	Nr. crt.	Numele	Vîrsta (ani)	Tratament cu Folcisteină Înainte de trat.	Folcisteină După trat.	Xilocaină Înainte de trat.	Xilocaină După trat.	Vîrsta (ani)	Numele	Nr. crt.
Bărbaţi	Val. medie	1	B.I.	60	10,0	10,12	1,3	25,8	57	E.E.	1
	30,6	2	D.G.	62	35,0	11,8	16,0	13,0	68	C.I.	2
	Nr. cazuri	3	M.A.	72	28,0	60,0	42,0	35,0	75	G.I.	3
	49	4	B.P.	71	12,0	43,0	75,5	80,0	76	A.N.	4
		5	D.V.	74	52,0	70,0	66,0	7,0	53	E.N.	5
		6	M.V.	63	16,5	78,0	30,0	72,0	72	B.N.	6
		7	D.I.	70	66,0	128,0	4,3	144,0	70	G.P.	7
		8	D.I.	72	28,5	8,0	3,5	10,5	76	N.D.	8
		9	G.M.	67	40,0	160,0					
Valoarea medie a diferenţei					31,2		18,5				
P					>0,05		>0,1				
Femei	Val. medie	1	S.I.	59	25,0	35,3	13,0	21,0	61	S.N.	1
	29,4	2	N.G.	70	14,0	11,0	7,0	7,2	62	M.L.	2
	Nr. cazuri	3	F.P.	58	75,0	72,1	26,4	96,0	64	E.P.	3
	40	4	E.D.	63	37,4	128,0	22,0	43,0	75	G.D.	4
		5	P.A.	56	33,0	144,0	39,6	41,0	75	N.M.	5
		6	G.I.	53	32,2	97,6	36,0	1,5	60	D.A.	6
		7	P.I.	63	36,0	80,0	3,2	40,0	75	F.M.	7
		8	B.S.	72	44,0	43,0					
		9	O.E.	73	44,0	43,0					
Valoarea medie a diferenţei					35,8		13,2				
P					=0,05		>0,1				

BIBLIOGRAFIE

1. Albeaux F., Bellot I., *Données nouvelles sur la chromatographie des 17-cetosteroides*, L'année endocrinologique, **VI**, 39 (1954). *Étude critique des données de la chromatographie de 17-K.S. neutris urinaris dans l'exploration de la fonction androgenique chez l'homme*, L'année endocrinologique, **IX**, 181 (1957).
2. Brown J. B., *Methods for determination of Oestriol, Oestron and Oestradyol*, Biochemical J., **60**, *2*, 185 (1955).
3. Cahen L. R., Salter R. W., *Dosage du 17-cétosteroides neutres urinaris*, J. Biol. Chem., **152**, 489 (1944).
4. Jayle F. M., Crepy O., *Téchnique de dosage du phenolsteroides urinaris*, Bull. Soc. Chim. Biol., **32**, *11*, 1067 (1950).
5. Oeriu S., *The Effect of Cystein on the Methionine Content of the Animal and Plant Organism*, în *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, 1959, p. 572.
6. Oeriu S., *La Cystéine facteur essentiel dans le retablissement de l'équilibre biochimique de l'animal âgé vers celui qui est propre à l'organisme jeune*, Rev. sc. méd., **VI**, *3—4*, 191 (1961).
7. Oeriu S., *Some New Biochemical Findings on the Biology of Age Changes*, în *Fifth Intern. Congress of Biochemistry* ,Moscow, Aug. 1961, Abstracts of Papers Pergamon Press, London, 1963, p. 205 (*b*).
8. Oeriu S., *Biochemie der Alterungsprozesse*, în *Conference with International Character of the Hungarian Gerontologie*, Budapest, October 25—27, 1962 (*a*).
9. Oeriu S., *Cystine and Free Ammonia in the Brain Tissue of old organism*, Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences, **X**, *12*, 519 (1962) (*b*).
10. Oeriu S., Costecu G., Teodorescu O., Şoimu I., *Etude de la cocarboxilase, de la transaminase et de la capacité d'acetylation en fonction de l'âge et du traitement à la cysteine et au vitamines qui jouent un rôle dans les processus de methylation et dans le métabolisme de soufre*, Rev. Franç. Geront. Paris, Octobre, 1962, p. 373.
11. Oeriu S., *New Conceptions of the Biochemistry of Aging Processes and of the Action of some SH Substances with Prophylactic and Curative Effect in Old Age*, în *Sixth Intern. Congr. of Gerontology*, Copenhagen, 1963.
12. Oeriu S., *Isledovanie otnoşenii mejdu vitaminami-coenzinami i sootvetstvuiuşcimi fermentami v zavizimosti ot vozrasta jivotnovo i pod deistviem nekotorîh veşcestv svoistvennîh organism*, Biochimia, **I**, 3—8 (1963) (*b*).
13. Oeriu S., *Einige Dates über die Anhäufung der S—S Gruppen in den Alterungsprozessen und deren Wirkung auf die enzymatischen Tätigkeit. Symposium Molekulare Zellphysiologie. Die rolle der SH-Gruppen für Struktur und Funktion*, Berlin, August, 1963 (*c*).
14. Oeriu S., Ionescu St., *Biochimie der biologischen Alterungsprozesse. Die Störung in der Metabolisierung der Vitamine einer der Faktoren der Alterungsprozesse*, Ztschft für Alternsforschung **15**, *4*, 308 (1962).
15. Oeriu S., Tănase I., *Aspetti biochimici di processo d'invechiamento nel sistema nervoso centrale*, Giornale di Gerontologia, **X**, 867 (1962).
16. Oeriu S., Tigheciu M., *Biochemie der biologischen Alterungsprozesse. Der Blut-Glutathionspiegel bei Tieren verschiedenen Alters und der Einfluss von verabreichtem Cystein, Vitamin B_6 . B_{12} und Folsäure auf die Glutation-Werte der alten Tiere*, Ztschft Alternsforsch., **15**, *4*, 314 (1962).
17. Oeriu S., Tigheciu M., Enache L., *Étude de quelques enzymes d'oxidoreduction en fonction de l'âge et du traitement à la cysteine et aux vitamines qui jouent un rôle dans les processus de methylation (B_{12}, acide follique) ou dans le métabolisme du soufre (B_6)*, Rev. Franc. Géront., Octobre 1962, p. 369.
18. Pond N. H., *Microchromatographic metods for separation of 17 Ketosteroids fractions*, The Lancet, **258**, 6690 (1951).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 293–305 (1965)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENȚEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

NOTA II. STUDIUL COMPARATIV AL ACTIVITĂȚII CATALAZEI LA CEREALELE DE TOAMNĂ, ÎN TIMPUL IERNII

I. BRAD

577.16 :633.1

Rezumat. — În lucrare sînt prezentate rezultatele obținute prin determinarea activității catalazei la specii, soiuri, organe cu rezistență diferită și la plante cultivate în condiții agrotehnice care influențează favorabil sau nefavorabil rezistența la ger.

Sînt prezentate de asemenea rezultate referitoare la variația coeficientului Q_{13} și a valorii raportului dintre activitatea catalazei la 17 și la 4°C. Se constată că nu există o concordanță categorică între activitatea catalazei și rezistența la ger. Se subliniază faptul că este necesară luarea în considerație nu numai a activității catalazei la un moment dat, ci și alura curbei în funcție de temperatură, valoarea activității, intensitatea scăderii sau creșterii, coeficientul Van't Hoff, precum și conținutul în alte substanțe ca vitamină C, glucide etc.

Interpretarea proceselor metabolice și a activității reale a catalazei nu poate fi justă fără corelația cu alți indici.

Într-o lucrare anterioară [11] a fost publicat un studiu referitor la relația dintre conținutul de vitamină C și rezistența la ger a cerealelor de toamnă. În lucrarea de față sînt prezentate rezultatele obținute la determinarea activității catalazei pentru aceleași variante la care a fost determinată și vitamina C. La acestea au fost adăugate rezultatele referitoare la variația coeficientului Q_{13} și rezultatele referitoare la variația raportului dintre activitatea catalazei la 17 și 4°C. Pentru acest raport a fost calculat și coeficientul Q_{13}.

Aceste ultime rezultate, obținute în 1956—1957, nu au fost publicate. Am considerat că integrarea lor în ansamblul rezultatelor obținute între 1958—1961 ar putea prilejui formularea unor concluzii care prezintă interes. În materialul bibliografic am enumerat lucrări în legătură cu activitatea catalazei, influența temperaturilor scăzute asupra plantelor și rezistența la ger, care au fost publicate atît înainte de începerea cercetărilor prezentate în această lucrare, cît și ulterior.

Aceste lucrări scot în evidenţă faptul că între constatările făcute de diferiţi cercetători există oarecare contradicţii Astfel, Levitt [21] citează lucrările lui Newton şi Brown, care găsesc o corelaţie directă între activitatea catalazei şi rezistenţa la ger a grîului; lucrările lui Langlot, care constată aceeaşi corelaţie la *Pinus silvestris* şi lucrările lui Ivanov, care nu constată vreo legătură între activitatea catalazei şi rezistenţa la ger a citruşilor. Existenţa unei corelaţii a fost semnalată şi de Rubin [29], Mihailovski [26], Blagoveşcenski şi Gavrilova [5]. Blagoveşcenski [4] şi Vasiliev [34] subliniază importanţa coeficientului Van't Hoff Q_{10} pentru determinarea viabilităţii plantelor, a rezistenţei lor la ger. Blagoveşcenski arată şi în lucrări mai noi [6] că valoarea acestui indice Q_{10} este mai mare la soiurile de grîu mai puţin rezistente. Se arată că fenomenul este asemănător şi pentru alte enzime — ca zaharaza şi polipeptidaza — şi la alte plante.

Kuşnirenko [19] constată că, prin călire seminţele germinate de porumb şi tomate arată o creştere a activităţii catalazei faţă de martor. Saakian [30] găseşte că activitatea catalazei este mai mare la soiurile de viţă de vie mai rezistente. Maruţian [23] arată că activitatea catalazei din floemul unui soi de viţă rezistent la ger este mai mare decît la un soi mai puţin rezistent. Belkin [1], [2] subliniază caracterul contradictoriu al rezultatelor obţinute la determinarea activităţii oxidazelor. Constată că, după călire, activitatea catalazei creşte la toate soiurile analizate. El explică micşorarea activităţii oxidazelor după scăderea temperaturii prin slăbirea respiraţiei şi crede că funcţia acestor enzime este încă destul de neclară.

Marinciuk şi Kurbatova [22] găsesc la trifoi o activitate mai mare a catalazei la soiul mai rezistent, cînd temperatura maximă este mai mare. După micşorarea temperaturii, activitatea catalazei la soiul mai rezistent este mai mică decît la soiul nerezistent. Proţenko [28] observă că în coaja mărului mai rezistent activitatea catalazei este mai mică şi scade iarna mult mai puţin decît la soiul mai puţin rezistent.

Polisciuk [27] ia în consideraţie activitatea catalazei la nucul grecesc, care creşte pînă în noiembrie şi scade pînă la jumătate pînă în martie. Iuhimciuk [17] consideră că scăderea activităţii catalazei şi un conţinut mai mare de hidraţi de carbon caracterizează o mai bună pregătire şi stabilitate la iernat a trifoiului. Lebedeva [20] arată că, la caişii rezistenţi la ger, activitatea catalazei a fost mai mare în timpul verii.

Valuţă, Brad şi Laszlo [33], [8], [9], făcînd determinări pe planta întreagă fără rădăcină, au găsit la soiul de orz cel mai rezistent o activitate a catalazei mai mică, dar nu au găsit activitatea cea mai mare la soiul cel mai nerezistent, iar analizînd secara, grîul şi orzul, constată cea mai mică activitate a catalazei la secară şi cea mai mare la orz. Prin hibridare vegetativă între secară şi orz, activitatea catalazei la hibridul mai rezistent obţinut este intermediară activităţii celor doi parteneri [10].

Referitor la influenţa nutriţiei minerale asupra rezistenţei la ger, numeroase indicaţii din literatură arată că fosforul şi potasiul favorizează rezistenţa la ger, în timp ce azotul micşorează rezistenţa la ger, mai ales atunci cînd este dat în cantităţi mari [12], [14], [21].

Rezultatele prezentate de noi fac parte dintr-un ansamblu de cercetări executate între 1958—1962. S-au studiat comparativ secara, grîul și orzul, cultivate pe teren neîngrășat, orzul neîngrășat sau îngrășat diferențiat cu superfosfat, sare potasică și azotat de amoniu (1958—1961) și un număr de 36 soiuri de grîu. Analizele au fost executate separat pe frunze și pe nodul de înfrățire cu hipocotil, în toate aceste cazuri. S-a analizat simultan conținutul în vitamina C, conținutul în substanțe reducătoare directe și reducătoare totale, conținutul în proteină brută și aminoacizi, conținutul în cenușă, fosfor și potasiu, aciditatea totală titrabilă, activitatea catalazei și peroxidazei, substanța uscată, capacitatea de reținere a apei și altele.

Prin analiza simultană în decursul mai multor ani a unui număr mai mare de indici biochimici și fiziologici, care pot fi corelați metabolic, prin compararea rezultatelor constatate la plante făcînd parte din specii și soiuri diferite, prin compararea rezultatelor constatate la plante crescute în condiții de nutriție minerală diferențiată și prin compararea rezultatelor constatate la organe diferite ale acestor plante, care se caracterizează prin rezistența diferită și prin răspuns diferit la variațiile de temperatură, s-a urmărit: să se găsească indici cît mai siguri de triere a plantelor după rezistență, să se acumuleze o sumă de date care să contribuie la stabilirea bazelor biochimice ale procesului de supraviețuire a plantelor, să se contribuie la depistarea în mare a punctelor, a secvențelor din metabolism unde este necesar să se intervină și a sensului în care trebuie să se desfășoare unele procese, pentru ca metabolismul plantei să favorizeze rezistența la ger.

S-a urmărit de asemenea să se găsească o explicație a rezultatelor aparent contradictorii și o perspectivă de lucru. În cele ce urmează sînt prezentate rezultatele în acest sens.

Contribuția acestei lucrări la elucidarea problemelor de biochimie a rezistenței la ger rezultă din ansamblul determinărilor executate și a concluziilor formulate în raport cu cercetările similare.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru efectuarea studiului comparativ între specii au fost alese secara din soiul Petkus — foarte rezistentă la ger, grîul din soiul A-15 cu rezistență medie la ger și orzul Cenad 396 (C-396) mai puțin rezistent la ger.

Pentru efectuarea studiului comparativ al activității catalazei în funcție de nutriția minerală, cu efect pozitiv sau negativ asupra rezistenței la ger, s-a lucrat cu orzul C-396. Au fost comparate 6 variante, prezentate detaliat în lucrarea anterioară. Pentru executarea studiului comparativ între soiurile de grîu au fost alese 36 de soiuri cu rezistență diferită, între care Étoile de Choisy și San Pastore ca soiuri foarte puțin rezistente, iar Minhardy și Lutescens 1060/10 ca soiuri foarte rezistente. Soiurile de grîu au fost supuse la temperaturi scăzute pînă la —18°C, în frigider. Temperatura inițială din frigider a fost egală cu temperatura din cîmp, scăderile de temperatură începînd de la această temperatură din cîmp. S-au făcut determinări la data recoltării, după supunere la —10°C și la —18°C.

După recoltare sau după scoatere din frigider, plantele au fost spălate repede cu apă rece şi svîntate forţat cu hîrtie de filtru. A fost separată frunza de nodul cu hipocotil şi de rădăcini. Asupra rădăcinilor n-au fost executate determinări.

Frunza şi nodul cu hipocotil au fost mărunţite rapid. După omogenizarea probelor mărunţite, s-au luat 2,5 g de nod cu hipocotil sau 5 g frunză mărunţită şi s-au mojarat fin cu nisip spălat, apă distilată şi carbonat de calciu, conform metodei descrise de Ermakov şi colab. [13]. Apoi probele au fost aduse cu apă distilată la 50 ml, respectiv la 100 ml. După agitare puternică timp de 30 min, probele au fost lăsate să se depună timp de alte 30 min. Supernatantul a fost decantat şi folosit pentru determinarea activităţii catalazei prin metoda gaz-volumetrică [13]. Soluţia de H_2O_2 utilizată a avut întotdeauna concentraţia necesară pentru ca din 10 ml de H_2O_2 neutralizată cu carbonat de calciu să se degaje 195—200 ml O_2. Această concentraţie a fost respectată pentru toate determinările de activitate a catalazei, în toţi anii. S-a lucrat cu 10 ml extract şi 10 ml soluţie de H_2O_2. Soluţia şi extractul au fost termostatate la 25°C, temperatură păstrată şi în baia ultratermostatului Höppler folosit pentru determinarea activităţii. Aparatul a fost confecţionat cu o singură biuretă de măsurare, pusă în legătură în partea inferioară cu rezervorul de soluţie H_2SO_4 5% în apă, iar în partea superioară cu un tub cu trei căi, dintre care una pentru legătura cu vasul de reacţie, iar a doua pentru aducerea lichidului din biuretă prin vidare la 0 ml, după încărcarea vasului de reacţie cu extract şi soluţie de H_2O_2 (fig. 1). S-a citit din minut în minut, pînă la 3 min, volumul de O_2 degajat. Cînd activitatea a fost foarte mare, timpul s-a redus la 1 min sau s-au micşorat cantităţile de extract şi soluţie de H_2O_2. S-a ţinut seama de aceasta la evaluarea activităţii pentru 10 ml extract şi 10 ml soluţie H_2O_2.

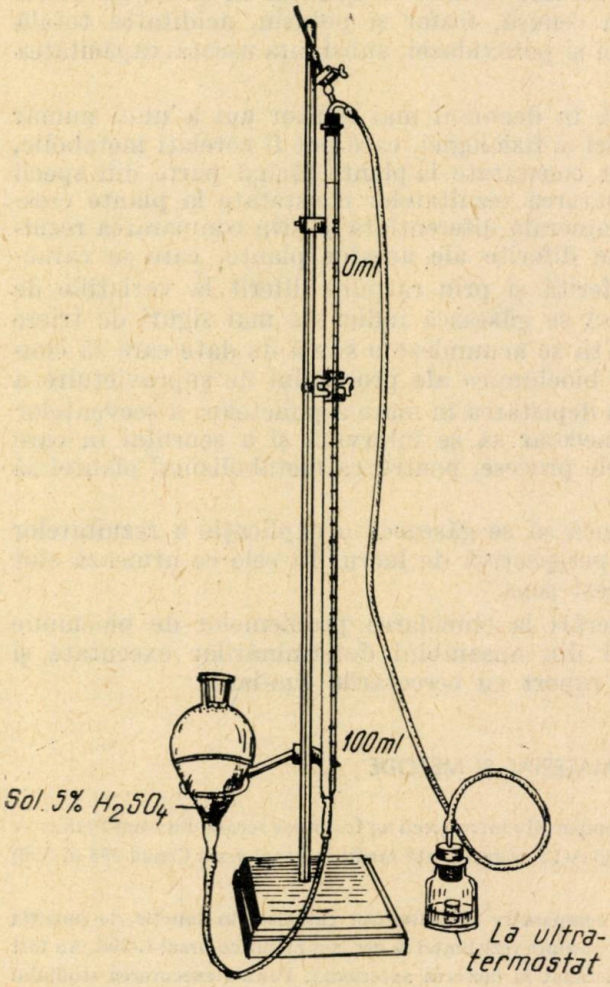


Fig. 1 — Determinarea catalazei la timpul 0.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza rezultatelor prezentate în tabelele ce urmează duce la constatarea că, pentru condițiile noastre de lucru, activitatea catalazei este mai mare în frunze decît în nodul cu hipocotil, în marea majoritate a cazurilor. Numai în timpul unei perioade de scăderi puternice de temperatură sau imediat după ele, activitatea catalazei din frunze (tabela nr. 2) poate ajunge egală sau mai mică decît activitatea catalazei din nod, ca de exemplu la datele 19.II.1959, 10.II.1960, 8.II și 22.II.1961 (tabela nr. 1), 8.II și 22.II. 1961 (tabela nr. 3). Același lucru se constată și dacă plantele sînt supuse la temperaturi scăzute artificial (tabela nr. 4).

Tabela 1

Variația activității catalazei în nodul cu hipocotil (n) și frunza (f) de secară, grîu și orz (în ml O_2 degajați în 3 min la 25°C) (1958—1961)

Varianta \ Data		1.XII 1958	15.XII 1958	8.I 1959	19.II 1959	3.III 1959	23.III 1959	7.IV 1959	22.IV 1959	12.V 1959	25.V 1959	8.VI 1959
secară	*n*	31	24	36	37	45	29	18				
grîu	*n*	47	51	45	55	76	59	52	faza de		împăiere	
orz	*n*	34	38	51	66	80	64	50				
secară	*f*	57	52	59	42	96	66	71	85	66	82	62
grîu	*f*	118	75	93	50	118	107	107	140	165	166	88
orz	*f*	64	48	106	61	126	114	124	67	88	134	66

Varianta \ Data		12.XII 1959	26.XII 1959	21.I 1960	10.II 1960	23.III 1960	14.IV 1960	29.IV 1960	16.V 1960	2.VI 1960	16.VI 1960
secară	*n*	31	52	36	39	35	25				
grîu	*n*	54	60	52	55	56	32		faza de	împăiere	
orz	*n*	46	48	53	66	45	28				
secară	*f*	60	75	51	35	66	52	56	108	58	47
grîu	*f*	87	100	61	55	68	79	87	114	55	86
orz	*f*	56	56	67	60	78	64	116	55	103	91

Varianta \ Data		19.XII 1960	10.I 1961	25.I 1961	8.II 1961	22.II 1961	14.III 1961	6.IV 1961	8.V 1961	30.V 1961	3.VI 1961
secară	*n*	45	35	49	52	48	31	28			
grîu	*n*	62	54	62	60	60	52	43	faza de	împăiere	
orz	*n*	43	41	50	52	67	47	35			
secară	*f*	91	79	82	49	52	92	96	79	59	46
grîu	*f*	106	98	86	61	60	100	120	86	66	38
orz	*f*	105	98	108	69	67	85	93	78	67	40

Este bine cunoscut că nodul de înfrățire cu hipocotil este mai rezistent la ger decît frunza. Rezultatele comparative între nod și frunze aduc după sine întrebarea dacă o mai mare activitate a catalazei înseamnă o mai mare rezistență la ger, și ce alte considerente trebuie luate în seamă pentru aprecierea rezistenței și interpretarea procesului metabolic. Rezultă clar că o activitate mare, care suferă scăderi puternice o dată cu scăderea temperaturii, nu este un semn de rezistență la ger. Este remarcabil de

Tabela 2

Variaţia activităţii catalazei din frunza de orz însămînţat pe teren neîngrăşat sau îngrăşat cu N, P, K în diferite proporţii (în ml O_2 degajaţi în 3 min la 25°C) (1959, 1960)

Varianta \ Data	22.IV 1959	12.V 1959	25.V 1959	8.VI 1959	29.IV 1960	16.V 1960	2.VI 1960	16.VI 1960
orz $N_0P_0K_0$	67	88	134	66	46	55	93	41
orz $N_1P_1K_1$	—	—	—	—	75	66	92	62
orz $N_3P_1K_1$	72	118	225	175	80	128	138	90
orz $N_1P_3K_1$	62	71	138	2	68	72	87	67
orz $N_1P_1K_3$	64	76	85	2	68	61	81	34
orz $N_3P_3K_3$	—	—	—	—	72	75	109	85

Tabela 3

Variaţia activităţii catalazei în nodul cu hipocotil (*n*) şi frunză (*f*) de orz însămînţat pe teren neîngrăşat sau îngrăşat cu N, P, K în diferite proporţii (în ml O_2 degajaţi în 3 min la 25°C) (1960–1961)

Varianta		19.XII 1960	10.I 1961	25.I 1961	8.II 1961	22.II 1961	14.III 1961	6.IV 1961	8.V 1961	30.V 1961	3.VI 1961
orz $N_0P_0K_0$	*n*	43	41	50	52	67	47	35	faza de împăiere		
orz $N_1P_1K_1$	*n*	48	41	54	57	77	45	38			
orz $N_3P_1K_1$	*n*	55	40	48	55	68	55	41			
orz $N_1P_3K_1$	*n*	53	39	46	65	77	44	34			
orz $N_1P_1K_3$	*n*	44	41	49	63	73	53	32			
orz $N_3P_3K_3$	*n*	56	45	53	59	69	60	36			
orz $N_0P_0K_0$	*f*	105	98	108	49	47	85	93	78	67	40
orz $N_1P_1K_1$	*f*	95	99	106	51	52	97	89	77	66	73
orz $N_3P_1K_1$	*f*	106	99	114	50	68	98	91*	97*	87*	105
orz $N_1P_3K_1$	*f*	94	93	100	57	58	94	90	76	75	42
orz $N_1P_1K_3$	*f*	90	88	104	56	58	82	95	69	47	62
orz $N_3P_3K_3$	*f*	98	100	105	53	60	88	93	82	75	81

* ml degajaţi în 1 min.

asemenea faptul că valorile atinse în perioadele de scăderi puternice de temperatură, specificate mai sus, se realizează în frunze prin scăderea activităţii catalazei faţă de cele mai multe valori anterioare. La grîu şi orz acest mers este mai evident. În nodul cu hipocotil de orz, valorile anterioare au fost întotdeauna mai mici. În nodul cu hipocotil de grîu şi secară valorile anterioare au fost fie mai mari, fie mai mici. Aceste constatări, asociate cu constatările similare din tabela nr. 4, scot în evidenţă vulnerabilitatea catalazei din frunze în general şi din frunzele de orz în special. În ciuda unei activităţi mai mari, activitatea catalazei din frunze poate să scadă, ajungînd inferioară activităţii catalazei din nod. Pe de altă parte este scos în evidenţă faptul că activitatea catalazei poate să şi crească sub influenţa temperaturilor scăzute. Momentul şi intensitatea creşterii sau scăderii activităţii în funcţie de temperatură şi durata acţiunii ei sînt condiţionate de particularităţile legate de specie, soi, organ şi nutriţie.

Tabela 4

Variația activității catalazei din nodul cu hipocotil și frunzele unor soiuri de grîu, exprimată în ml O_2 degajați în 3 min la 23°C. Activitatea determinată la data recoltării sau după supunere la —10° și —18° în frigider (1961—1962)

Soiul	Organul	nod				frunze							
	Data recoltării	21.XI	22.I			6.III			22.I		6.III		
	Data determinării	21 XI	22 I	25 I	1 II	6 III	12 III	16 III	25 I	1 II	6 III	12 III	16 III
	Temperatura	4°	—3°	—10°	—18°	6°	—10°	—18°	—10°	—18°	6°	—10°	—18°
A-15		52	84	55	69	77	72	50	104	88	108	70	62
440-C		58	82	58	—	65	68	48	69	—	96	57	43
495-C		57	76	60	66	64	75	80	94	85	107	75	42
131-C		54	77	73	59	71	81	72	101	68	78	73	58
578-BB		51	79	73	67	66	72	50	114	89	108	70	56
405-B		56	75	55	59	62	53	46	72	67	69	47	55
804-B		50	91	88	75	78	74	66	104	85	100	77	50
520-B		55	80	53	55	75	85	82	73	59	105	79	86
Studina 159		44	69	55	50	55	58	48	84	73	86	45	59
Iași 645		50	73	49	—	51	67	57	98	85	77	61	57
Cenad 117		49	63	43	—	54	68	53	69	68	85	72	54
Odvos 241		44	40	42	—	50	56	39	75	69	83	57	52
Bezostaia 1		47	76	63	49	67	77	65	88	77	100	55	49
Bezostaia 4		47	68	52	—	62	65	55	64	—	99	55	61
Skorospelka 3		45	68	52	48	61	63	54	77	81	104	60	60
Beloțerkovskaia 198		55	66	65	48	91	89	76	98	—	102	77	88
Osetinskaia 3		44	66	38	42	57	62	53	65	50	85	52	56
Mironovskaia 264		43	69	64	69	88	86	71	102	—	117	68	62
Miciurinka		35	39	42	53	66	44	60	56	72	92	50	70
Odessa 3		50	72	53	—	80	87	67	73	—	115	88	68
Hostianum 237		43	60	67	91	76	85	62	131	—	96	66	74
Lutescens 1060/10		48	87	63	77	80	79	71	102	92	109	67	70
Kooperatorka		39	76	61	67	65	57	74	101	—	107	68	74
Ponca		52	76	55	70	73	60	36	67	—	85	58	77
Triumph		50	72	43	70	78	82	62	65	90	91	66	49
Wichita		41	69	51	84	62	79	42	78	83	79	64	52
Concho		52	63	61	—	64	74	54	94	—	89	63	53
Motinave		40	60	58	—	61	62	40	86	76	71	47	43
Etoile de Choisy		39	67	45	—	59	61	50	86	61	77	93	56
San Pastore		43	73	56	63	63	70	53	79	66	70	48	47
Harach		35	61	65	—	69	66	60	95	—	83	61	64
Nr. 301		54	88	51	—	66	61	51	91	80	69	56	43
457-B		42	69	51	—	71	89	66	89	95	94	63	40
Minhardi		48	100	55	77	55	74	46	78	99	98	72	53
Lutescens 329		—	81	51	91	74	125	76	127	98	114	119	48
Bankut 1201		—	86	63	59	64	98	55	96	62	94	76	63

Dacă se analizează tabela nr. 1, care conține rezultatele comparative între secară, grîu și orz, se constată că activitatea catalazei la începutul iernii este mai mare la grîu decît la orz, la care activitatea este mai mare sau egală și rare ori mai mică decît la secară. În perioadele de temperaturi scăzute (8.I., 19.II., 3.III.1959; 12.I., 10.II., 23.III.1960 și 25.I., 8.II., 22.II.1961), ordinea se schimbă, activitatea catalazei ajungînd mai mare la orz, urmat de grîu și de secară, atît în nod cît și în frunze. În ciuda dife-

renţelor mari care există între rezistenţa la ger a celor trei specii alese şi a organelor lor, diferenţele între activităţile catalazei nu sînt tot atît de mari. Ceea ce diferă mult este aspectul curbei sau, cu alte cuvinte, dependenţa de variaţiile de temperatură. Activitatea catalazei la secară, mai ales la nod, suferă variaţii mult mai mici în funcţie de variaţiile de temperatură şi de celelalte condiţii din timpul iernii. Faptul că în momentul celor mai mici temperaturi atinse iarna se constată şi conţinutul cel mai mare de vitamină C [11] şi de substanţă reducătoare la speciile mai rezistente [1], sugerează că diferenţa între activitatea catalazei la cele trei specii corespunde cu diferenţa reală între stările de latenţă realizate de fiecare specie. Dar dacă între secară şi orz, atît în nod cît şi în frunze, diferenţele sînt foarte clare atît în ceea ce priveşte valoarea activităţii catalazei cît şi în ceea ce priveşte variaţiile în funcţie de temperatură, între grîu şi orz aceste diferenţe sînt mai puţin clare. Aceasta atrage atenţia că o activitate mai mică nu este o condiţie şi nici nu exprimă suficient rezistenţa faţă de ger. De aceea apare ca necesară asocierea activităţii catalazei cu alţi indici biochimici şi recurgerea şi la alte procedee pentru formularea unei concluzii juste.

Constatările de pînă acum sînt întărite de analizele executate la grîu (tabela nr. 4), care sînt în concordanţă şi cu constatările altor cercetători [26]. Din tabelă rezultă că activitatea catalazei din nod creşte în luna anuarie (−3°) faţă de noiembrie (4°), la 33 din 34 dintre soiuri. La această dată, activitatea este mai mare în majoritatea cazurilor, chiar şi faţă de luna martie (6°). Dacă în ianuarie supunem nodul la o scădere puternică de temperatură (−10°), în 32 de cazuri din 36 activitatea catalazei scade foarte puternic. Creşterea activităţii catalazei în nod este deci favorizată pînă la o temperatură destul de scăzută, care o dată atinsă şi depăşită provoacă scăderea activităţii. Continuînd scăderea temperaturii la −18°, în 12 cazuri din 24 analizate activitatea catalazei creşte, în celelalte cazuri scăzînd. Creşterile se constată a fi mai puternice la soiurile Lutescens 329, Minhardy, Hostianum 237, Lutescens 1060/10, rezistente sau foarte rezistente la ger. În martie, în acelaşi organ, prin supunerea la temperatura de −10° se constată o creştere în 23 de cazuri, iar după supunerea la −18° se constată o creştere faţă de −10° numai în 3 din 36 de cazuri posibile. Aceasta arată variaţia în timp a calităţii enzimelor sau a proprietăţii de protejare, indiferent de rezistenţa unui organ. Tot din analiza tabelei nr. 4 rezultă că în frunze predomină fenomenul de scădere a activităţii catalazei o dată cu scăderea temperaturii. Se constată într-adevăr tendinţa ca activitatea catalazei din nod la soiurile foarte rezistente citate, să fie mai mare după supunerea plantelor respective la temperaturi scăzute. Dacă se continuă scăderea temperaturii, se constată frecvent creşterea activităţii catalazei în nodul cu hipocotil, la soiurile rezistente sau foarte rezistente. Totuşi, şi printre soiurile mai puţin rezistente se constată valori ale activităţii catalazei apropiate de cele corespunzătoare soiurilor rezistente.

[1] I. Brad, Lucrare în pregătire.

Compararea rezultatelor la soiurile Minhardy, Beloțerkovskaia 198, Hostianum 237, Lutescens 1060/10, Odessa 3, Lutescens 329, care sînt soiuri rezistente, cu rezultatele determinărilor la soiurile Fortunato, San Pastore, Étoile de Choisy, Bankut 1201, Kooperatorka, Odvos 241, care sînt soiuri cu o rezistență slabă, permite formularea concluziei de mai sus.

Efectul nutriției minerale asupra activității catalazei — și prin aceasta și asupra rezistenței la ger — este evidențiat de rezultatele obținute la orz prin îngrășarea diferențiată cu N P K (tabelele 2, 3). Analizele executate în 1959 și 1960 (tabelul 2) arată diferențele considerabile care se constată în timpul verii și primăverii între variantele cu $N_3P_1K_1$ și $N_1P_3K_1$, $N_1P_1K_3$. Aceeași diferență se observă și din tabelul 3, fapt constatat și în alte cercetări, executate la alte plante [3]. În timpul toamnei și iernii, pînă la perioada de lungă durată cu temperaturi scăzute sub 0°C, la variantele cu mai mult azot ca îngrășămînt activitatea catalazei este de cele mai multe ori mai mare sau egală cu activitatea de la celelalte variante (tabela nr. 3). La 8.II.1961, activitatea catalazei la variantele $N_1P_3K_1$ și $N_1P_1K_3$ este mai mare, atît în nod cît și în frunză, decît la oricare dintre celelalte variante. Scăderile cele mai puternice se observă la varianta $N_3P_1K_1$, la care activitatea catalazei din frunze, care fusese de două ori și jumătate mai mare decît activitatea din nod, ajunge mai mică decît în nod. Totodată, la varianta cu mai mult îngrășămînt fosfatic și potasic activitatea catalazei în nodul cu hipocotil ajunge apreciabil mai mare față de oricare valoare anterioară, proces ce nu se constată deloc la varianta $N_3P_1K_1$. Deci, pe de o parte azotatul de amoniu favorizează creșterea activității catalazei, pe de altă parte creează condiții care nu permit protejarea ei. Faptul că în timpul scăderii temperaturii pînă la limita atinsă de experiențele de pînă acum s-a constatat creșterea activității catalazei în nodul cu hipocotil, în special la variantele $N_1P_3K_1$ și $N_1P_1K_3$ de orz, arată creșterea capacității de protejare sau de stimulare prin creșterea conținutului în unele substanțe ca glucidele [2], vitamina C [11] și altele. Totodată însă se ridică și problema dacă această enzimă nu există și sub o altă formă, mai puțin activă dar mai rezistentă la criodenaturare, care o dată cu scăderea temperaturii poate deveni mai activă, dar mai vulnerabilă. În nod această activare se realizează în condiții care pot să asigure o anumtiă protecție. S-ar putea deduce că în cazul unei rezistențe mari această activare are loc la o temperatură scăzută, la care, în cazul unei plante nerezistente, se întîmplă o distrugere a catalazei. Creșterea activității catalazei este necesară de altfel pentru a compensa inhibarea activității fără denaturare prin însăși scăderea temperaturii mediului. Micșorarea activității catalazei se poate datora nu numai unei denaturări reversibile sau ireversibile [32], ci și unei treceri într-o formă mai stabilă, diferită calitativ și mai puțin activă, care se poate reactiva. Deoarece rezultatele referitoare la valoarea absolută a activității catalazei nu au dat o suficientă satisfacție, s-a insistat asupra aspectului calitativ exprimat prin determinarea coeficientului Van't Hoff.

[2] I. Brad, Lucrare în pregătire.

Din analiza tabelei nr. 5 privind variaţia coeficientului Q_{13} la catalaza din orz se constată că şi această caracteristică, legată de calitatea unei enzime, este variabilă în timp, în funcţie de temperatură şi soi. La soiul Odessa-Solovei, foarte rezistent, se constată că, înainte de intrarea în iarnă, acest coeficient este mai mare decît la celelalte, dar ajunge mai mic decît la oricare dintre ele. Şi la celelalte soiuri se constată micşorarea coeficientului Q_{13}, care este însă mai lentă, fără să ajungă la valori mai mici decît cea constatată la soiul Odessa-Solovei. Aceste date atrag atenţia şi asupra faptului că este importantă nu numai valoarea coeficientului Van't Hoff, ci şi rapiditatea cu care un echipament enzimatic îşi modifică calitatea. În acelaşi timp se mai poate formula o rezervă, impusă de probabilitatea ca un acelaşi coeficient Van't Hoff să corespundă la valori absolute ale activităţii catalazei foarte diferite. În ciuda unui coeficient Van't Hoff egal, între aceste două cazuri nu se poate pune semnul egalităţii. Din datele din tabelul 6 se poate constata că raportul dintre activitatea catalazei din orz la două temperaturi îndepărtate este tot aşa de folositoare ca şi coeficientul Van't Hoff. Acest ultim indice, care se calculează ţinîndu-se seama de concentraţia iniţială şi finală a substratului, scoate în evidenţă faptul că enzimele soiurilor mai rezistente sînt capabile să acţioneze asupra substratului chiar după o micşorare puternică a concentraţiei acestuia. Raportul calculat de noi ia în consideraţie cantitatea de oxigen degajată, prin aceasta scoţîndu-se în evidenţă faptul că enzimele soiurilor mai rezistente sînt mai active la temperaturi scăzute. Din îmbinarea acestor constatări rezultă că determinarea activităţii catalazei la temperaturi apropiate de 0°C, folosind soluţii de H_2O_2 mai diluate, ar putea fi un procedeu de perspectivă care ar permite o triere mai bună a soiurilor şi o interpretare mai justă a proceselor metabolice.

Prin asocierea altor indici cu determinarea activităţii catalazei, se evită deducerea unor concluzii greşite la interpretarea şi aprecierea rezistenţei. Dacă două soiuri au o activitate catalazică egală, mai rezistent este indiscutabil soiul cu un conţinut mai mare de glucide. Aceasta dove-

Tabela 5

Variaţia coeficientului Q_{13} la cîteva soiuri de orz cu rezistenţă diferită la ger, în condiţiile de iernare ale anului 1956—1957

Soiul \ Data	8.XI 1956	28.XI 1956	7.I 1957	22.I 1957	18.II 1957	27.III 1957	11.V 1957
Odessa-Solovei	2,62	2,09	1,17	1,96	2,11	4,73	2,14
Mahndorfer	2,38	2,55	1,67	1,37	2,40	3,65	2,35
Cenad 396	2,32	2,43	1,47	1,38	1,44	3,14	2,53
Cenad 345	2,15	1,79	1,65	1,65	1,90	4,32	2,70

deşte că în soiul mai rezistent avem o catalază puternică, fără să fie activă, din cauza complexului existent în celulă. La soiul mai puţin rezistent, conţinutul mic de zaharuri demonstrează că activitatea mare a catalazei se datoreşte proceselor active intense, care induc această activitate mare

și care provoacă micșorarea conținutului de glucide, provocînd în același timp micșorarea conținutului de substanțe de protecție și de rezervă. O activitate catalazică mare și un conținut de acid ascorbic mare obligă la aceeași concluzie ca și cea formulată mai sus. Numai dintr-un ansamblu de indici se poate deduce dacă ordonarea după determinările „in vitro" corespunde

Tabela 6

Variația raportului între activitatea catalazei la 17°C și la 4°C la cîteva soiuri de orz (activitate exprimată în ml O_2 degajați în 3 min) (1956—1957)

Soiul \ Data	8.XI 1956	28.XI 1956	7.I 1957	22.I 1957	18.II 1957	27.III 1957	11.V 1957
Odessa-Solovei	2,35	1,96	1,12	1,81	1,90	3,88	1,89
Mahndorfer	2,68	2,23	1,55	1,43	2,15	2,99	2,12
Cenad 396	2,19	2,16	1,44	1,25	1,36	2,81	2,20
Cenad 345	1,96	1,69	1,52	1,59	1,73	3,48	2,41

unor stări de fapt *in vivo*. Aceste rezerve sînt impuse de multitudinea reacțiilor din care poate rezulta H_2O_2, competiția peroxidazei pentru H_2O_2, lipsurile metodei actuale legate și de prezența stimulatorilor și inhibitorilor și a altor condiții diferite de cele naturale [7], [18], [24], [31].

CONCLUZII

1. Activitatea catalazei în frunză este mai mare decît în nodul cu hipocotil, dar mai vulnerabilă față de scăderile de temperatură, scăzînd puternic o dată cu scăderea acesteia.

2. Activitatea catalazei din nodul cu hipocotil poate să crească, să scadă și din nou să crească prin scăderea temperaturii. Valoarea temperaturii care provoacă aceste variații este în funcție de particularitățile legate de specie, soi, organ și nutriție minerală. Există tendința ca, în cazul unei rezistențe mari, activitatea catalazei să crească la temperaturi foarte scăzute.

3. Activitatea catalazei la soiurile de grîu se diferențiază mai puternic după supunerea plantelor la temperaturi mai scăzute. Se observă tendința ca la soiurile mai rezistente activitatea catalazei să fie mai mare după scăderea puternică a temperaturii.

4. Activitatea catalazei la secară este mai mică decît la grîu și la acesta mai mică decît la orz, numai în perioada celor mai scăzute temperaturi. Se constată că la secară, variațiile activității catalazei în funcție de temperatură sînt mai mici.

5. Îngrășămintele minerale influențează puternic activitatea catalazei. Azotatul de amoniu favorizează creșterea activității catalazei în special vara, dar nu favorizează protejarea acestei enzime. Superfosfatul și sarea potasică creează condiții de protejare a activității catalazei în condiții de scădere a temperaturii.

6. Nu există o concordanţă deplină între activitatea catalazei şi rezistenţa la ger şi nu se poate deduce întotdeauna existenţa unei concordanţe între constatările analitice prin metoda noastră şi activitatea „in vivo".

7. Aprecierea rezistenţei după activitatea catalazei trebuie să fie făcută ţinîndu-se seama simultan de aspectul curbei în funcţie de temperatură, coeficientul Van't Hoff, raportul între activitatea catalazei la două temperaturi îndepărtate, intensitatea creşterii şi scăderilor activităţii.

8. Pentru o ordonare mai riguroasă a soiurilor după rezistenţă şi pentru interpretarea proceselor legate de activitatea catalazei, trebuie luate în consideraţie şi determinările referitoare la substanţele plastice sau catalitice legate de activitatea catalazei.

9. Rezultatele referitoare la coeficientul Van't Hoff şi raportul activităţii catalazei la două temperaturi îndepărtate sînt caracteristice calitative care scot în evidenţă faptul că şi calitatea enzimelor variază la aceeaşi plantă în cursul perioadei de vegetaţie. S-ar părea că la plantele mai rezistente modificările calitative favorabile se desfăşoară mai rapid.

10. Determinarea activităţii la temperaturi apropiate de 0°C cu utilizarea unor soluţii mai diluate de H_2O_2 considerăm că poate constitui un procedeu de perspectivă.

Prezentată la redacţie la 8 aprilie 1965

Secţia de fiziologie şi biochimie vegetală a Institutului de cercetări pentru cereale şi plante tehnice, Fundulea-Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Belkin I. I., *Biohimiceskii pokazateli zimostoikosti i sposobi borbi s gibeliu zimuiuşcih rastenii*, Zimostoikosti selskohoziaistvennîh kultur, Moskva, 1960, p 15.
2. Belkin I. I., *Zimostoikosti rastenii*, Izd. Ştiinţa Kişinev, 1961.
3. Bîlteanu Gh., Brad I., Voica Rada, *Influenţa nutriţiei minerale asupra activităţii catalazei la floarea-soarelui şi porumb*, St. cerc. Biol. seria biologie vegetală, **XIV**, 287 (1962).
4. Blagovescenski A. V., *Bazele biochimice ale procesului de evoluţie la plante*, Edit. agrosilvică de Stat, Bucureşti, 1953.
5. Blagovescenski A. V., Gavrilova L. V., *Zimostoikosti ozimîh pşeniţ i kacestvo fermentov*, Dokl. Akad. Nauk SSSR, **95**, 607 (1954).
6. Blagovescenski A. V., *Fermenti i holodostoikosti rastenii. Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1960, p. 106.
7. Bodea Cornel, *Tratat de biochimie vegetală*, Edit. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1959.
8. Brad I., Laszlo Iulia, Valuţă G., *Studii fiziologice şi biochimice asupra comportării unor soiuri de orz în condiţii de iernare*, Analele I.C.A.R., **XXVII**, seria C, 35 (1959).
9. Brad I., Laszlo Iulia, *Studiul comportării cîtorva indici biochimici şi fiziologici la secară, grîu şi orz în condiţiile de iernare ale anului* 1957—1958, St. cerc. Biochim., **3**, 65 (1960).
10. Brad I., Laszlo Iulia, Valuţă Gh., Miclea Clementa, *Influenţa transplantării embrionului de orz pe endospermul de secară, asupra unor procese biochimice la hibrizi în corelaţie cu rezistenţa la ger*, St. cerc. Biochim., **5**, 551 (1962).

11. Brad I., *Studiu comparativ al conținutului de vitamina C la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. Biochim. **8** (1965).
12. Davidescu D., *Agrochimia*, ed. a II-a, Edit. agrosilvică, București, 1963.
13. Ermakov A. I., Arasimovici V. V., Smirnova-Ikonikova M. I., Muri I. K., *Metodî biohimiceskogo issledovania rastenii*, Moskva-Leningrad, 1952.
14. * * * *Fiziologiia ustoicivosti rastenii, Trudî Konferenții 3—7 Marta, 1959*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1960.
15. Feinstein R. N., Seaholm J. E., Ballanoff L. B., *Effect in catalase of compounds related to aminotriazol*. Argonne National Laboratory Argonne-Illinois USA, *Sixth international congress of biochimistry, New York, 26 iul.—1 aug., 1964*, Section IV, *Mechanism of enzyms action*, Abstract 45.
16. Gavrilova L. V., *Haracteristica zimostoikosti ozimîh pșeniț kirovskoi oblasti*, Uspehi Zap. Kirovoskovo ped. instituta, **9**, 3 (1955).
17. Iuhimciuk F. F., *Fiziologiceskie osnovî zimostoikosti klevera, Zimostoikosti selskohoziaistvennîh kultur*, Moskva, 1960, p. 183.
18. Kretovici V. L., *Bazele biochimiei plantelor*, Academia R.P.R., I.S.R.S., București, 1960.
19. Kușnirenko A. P., *Fiziologiceskie osobennosti tomatov i kukuruzî, zakalennîh k holodu peremennîmi temperaturami*, Fiziologiia rastenii, **5**, 235 (1958).
20. Lebedeva T. A., *Aktivnost polifenoloxidazî v listiah zimostoikovo i nezimostoikovo abrikosa „Itogi naucino-issled. rabotî. Sev. — Kavkazsk. zonaln. n.-i. m.-t. sadovodstva i vinogradarstva"*, Krasnodar, 1959, p. 253—259.
21. Levitt J., *The hardiness of plants*, New-York, 1956.
22. Marinciuk A. F., Kurbatova A. T., *Dîhanie i okislitelnîe fermentî u zimostoikogo i maloustoicivogo sortov klevera Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Izd. Akad. Nauk, SSSR, Moskva, 1960, p. 136.
23. Maruțian S. A., Mantașian E. A., *Acțiunea enzimelor oxidante ale diferitelor țesuturi de viță în funcție de rezistența la ger*, Vitic., vinific., pomic. și legumic., Caiet selectiv, 1961, **6**, 384 (1961).
24. Masov H. S., *Mecanism of oxigen metabolism*, Advances in enzimology, **19**, 70 (1957).
25. Mihailovski A. G., *Fiziologiceskie biohimiceskie osobennosti zimostoikosti kreajevîh kleverov. Priemî povîșenia ustoicivosti ozimîh pșeniț i klevera protiv neblagopriatnîh uslovii vneșnei sredî*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Kiev, 1954.
26. Milică C. I., Pîrjol Liana, Juncu Ana-Maria, Brad I., Hurduc N., *Cercetări fiziologice și biochimice asupra rezistenței la ger a unor soiuri de grîu de toamnă*, Analele I.C.C.P.T., vol. **31**, seria C, 18 (1964).
27. Polișciuk L. K., *Zavisimosti zimostoikosti greșkogo oreha ot pogodnîh uslovii goda. Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1960, p. 366.
28. Proțenko D. F., Bogomaz E. I., *Ob osobennostiah obmena vescestv i razlicinîh po morozostoikosti plodovîh kultur. Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1960, p. 241.
29. Rubin B. A., *Okislitelnîe proțessî i ih rol v biologii razlicinîh rastenii. Biohimia plodov i ovoșcei*, vol. 2, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1951.
30. Saakian R. G., *O nekatorîh biohimiceskih proțessah u raznîh po morozostoikosti sortov vinograda*, Fiziologiia rastenii, **6**, 219 (1959).
31. Soru Eugenia, *Biochimie medicală*, vol. I, ed. II, Edit. medicală, București, 1959.
32. Ulrich H., Heber U., *Das Verhalten von Fermenten und Fermentsystemen gegenüber tiefen Temperaturen*, Mitteilung IV., Planta, **57**, 370 (1961).
33. Valuță G., Brad I., Laszlo Iulia, *Schimbări fiziologice și biochimice la orzul de toamnă în condițiile de iernare ale anului* 1956—1957, St. cerc. Biochim., **2**, 147 (1959).
34. Vasiliev I. V., *Zimovka rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1956.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 307–312 (1965)

ACȚIUNEA HISTAMINEI, ADRENALINEI ȘI ACTH-ului ASUPRA ACTIVITĂȚII CATALAZEI SANGUINE

A. CSONTOS

577.15 : 577.17

Rezumat. — Se studiază unele relații hormono-enzimatice, urmărindu-se efectul histaminei, adrenalinei și ACTH-ului asupra activității catalazei sanguine. Rezultatele obținute au arătat că *in vitro*, ca și *in vivo* în experiențe efectuate pe șobolani, sub influența acestor hormoni activitatea catalazei sanguine scade în mod semnificativ. Această scădere în activitatea enzimatică a fost interpretată ca rezultatul inhibiției enzimatice. La oameni sănătoși și la diferite îmbolnăviri cu catalazemia inițială normală, histamina, adrenalina și ACTH-ul au produs de asemenea un efect de scădere în activitatea catalazei. În boala canceroasă, cu catalazemia inițială crescută, hormonii menționați produc o creștere semnificativă a activității enzimatice.

În literatura de specialitate nu dispunem de date suficiente despre felul în care hormonii pot modifica activitatea enzimatică [1], [2]. Sutherland [10] demonstrează pentru prima dată că adrenalina, *in vitro* și *in vivo*, mărește activitatea fosforilazei din ficat. Alte date din literatură [8] arată că adrenalina inhibă activitatea ureazei, invertazei, lipoxidazei, histidin-decarboxilazei și dioxifenil-alanin-decarboxilazei. Studiindu-se acțiunea histaminei în procesul de inhibare enzimatică, s-a constatat [8], [10] că histamina are un efect inhibitor asupra activității adenozintrifosfatazei și histidinazei. Inhibarea sau stimularea activității enzimatice este un proces biologic fundamental, întrucît modificările activității enzimatice sînt urmate de modificări ale întregului metabolism celular. Hoffmann [7], prin extirparea unor glande endocrine, demonstrează modificările obținute în activitatea enzimatică. Legătura strînsă dintre hormoni și enzime este evidențiată și prin faptul că biosinteza hormonilor are loc cu participarea unor enzime.

Rolul biologic al catalazei sanguine a fost mult studiat, însă nu dispunem de date suficiente pentru a considera problema ca deplin rezolvată. În anii din urmă, efectuînd o serie de lucrări privitoare la patologia catalazei sanguine, am constatat că în unele îmbolnăviri activitatea catalazei crește, iar în alte procese patologice ea scade în mod foarte semni-

ficativ [3], [4]. În cursul acestor studii am obținut unele date din care se deduce că activitatea catalazei sanguine este influențată de o acțiune hormonală [5].

În lucrarea de față, continuînd aceste studii asupra corelațiilor hormono-enzimatice, am urmărit felul in care unii hormoni pot modifica activitatea catalazei sanguine.

MATERIAL ȘI METODE

Obiectul cercetărilor a fost acțiunea histaminei, adrenalinei și ACTH-ului asupra activității catalazei sanguine. În acest scop am efectuat analize *in vitro* și cercetări experimentale *in vivo*, care au fost urmărite atît pe animale cît și pe indivizi sănătoși și cu unele maladii.

La analizele efectuate *in vitro* am pipetat în eprubete cantitatea respectivă de substanță hormonală, la care am adăugat 1 µl de sînge. După 10 min la 37°C am introdus în sistemul de reacție perhidrol.

Pe un număr de 50 de șobolani masculi în greutate de 150—200 g am urmărit efectul hormonilor studiați asupra actvității catalazei. La începutul experienței am determinat activitatea inițială a catalazei, după care animalele au fost injectate zilnic, timp de 4 săptămîni, cu cantitatea respectivă de hormoni. Activitatea catalazei sanguine a fost determinată la 3, 7, 14, 21 și 28 de zile de la începutul experienței. Animalele de control au fost ținute și hrănite în condiții similare cu cele de la loturile experimentale. Experiențele cu histamină, adrenalină și ACTH au fost efectuate și la indivizi sănătoși (voluntari), precum și la bolnavi. Marea majoritate a cazurilor au fost recrutate dintre cei examinați prin proba Thorn cu adrenalină și ACTH. Am injectat persoanei examinate 0,2 mg histamină, 1 mg adrenalină sau 25 U.I. ACTH, pe cale subcutanată. Activitatea catalazei a fost determinată înainte, la 15, 30 și 60 de minute și la 4 ore după injectarea hormonilor. Determinările s-au făcut după principiul metodei Bach Zubkova, modificată de noi [3—5]. În cazuri fiziologice, catalaza din 1 µl de sînge descompune în timp de 30 de minute, la 37°C (pH 7,2—7,4), între 7 și 8,5 mg apă oxigenată.

Rezultatele obținute s-au prelucrat statistic cu ajutorul testului *t*.

REZULTATE

Rezultatele experimentale privind efectul histaminei, adrenalinei și ACTH-ului *in vitro* asupra activității catalazei sanguine sînt prezentate în tabela nr. 1.

Pe baza acestor date constatăm o scădere foarte semnificativă în activitatea catalazei sanguine după adaosul substanțelor examinate.

Injectînd zilnic preparate hormonale la șobolani, am obținut modificări în activitatea catalazei sanguine, cum se arată în tabela nr. 2.

Deci histamina și adrenalina, injectate zilnic la șobolani, provoacă de asemenea o scădere semnificativă a activității catalazei sanguine începînd din a 3-a zi și pînă la sfîrșitul experienței.

Rezultatele obținute la un număr de 185 de oameni sănătoși sau bolnavi sînt trecute în tabela nr. 3.

Tabela nr. 1

Variațiile activității catalazei sanguine în urma adăugării de substanțe hormonale (mg H_2O_2 descompuse în timp de 30 min la 37°C)

Substanța adăugată la 1 μl de sînge	Cazuri examinate	Activitatea catalazei sanguine				
		Valoarea inițială		După adăugarea substanței examinate		
		M*	s**	M	s	P***
Histamină 0,02 mg	50	7,65	0,25	6,20	0,45	0,001
Adrenalină 0,01 mg	25	8,10	0,30	7,25	0,35	0,001
ACTH 0,02 U.I.	25	7,70	0,35	7,00	0,38	0,001

* M = media valorilor calculate în mg
** s = deviația standard
*** P = probabilitatea de transgresiune

Tabela nr. 2

Variațiile activității catalazei sanguine la șobolani tratați cu substanțe hormonale (mg H_2O_2 descompuse în timp de 30 min la 37°C)

Substanța injectată	Animale tratate	Activitatea catalazei sanguine									
		Valoarea inițială	După inoculări zilnice la :								
			3 zile		7 zile		14 zile		21 zile		28 zile	
		M s	M s	P	M s	P	M s	P	M s	P	M s	P
Histamină 0,02 mg	20	3,80 0,1	3,15 0,05	0,001	3,25 0,05	0,001	3,35 0,06	0,001	3,40 0,08	0,001	3,35 0,08	0,001
Adrenalină 0,01 mg	15	3,78 0,2	3,30 0,1	0,001	3,20 0,1	0,001	3,40 0,05	0,001	3,52 0,08	0,001	3,60 0,07	0,001
Control	15	3,68 0,15	3,70 0,05	0,7—0,8	3,68 0,05	1,0	3,70 0,08	0,7—0,8	3,68 0,05	1,0	3,70 0,08	0,7—0,8

Semnificația prescurtărilor ; ca în tabela nr. 1.

Rezultatele obținute la indivizii sănătoși și la cei cu diferite îmbolnăviri, cu catalazemia inițială normală, demonstrează și ele o scădere semnificativă în activitatea catalazei, și anume timp de 60 de minute, după care valorile revin spre cele inițiale. În boala canceroasă, histamina, adrenalina și ACTH-ul determină însă o creștere a activității catalazei sanguine, și anume după histamină și ACTH activitatea enzimatică crește în mod semnificativ pe tot timpul experienței, pe cînd după adrenalină această creștere este semnificativă numai timp de 60 de minute.

Ținem să menționăm că proba Thorn a fost pozitivă în 96% din cazuri, iar cazurile de boală canceroasă, cu diferite localizări, au fost confirmate histologic și radiologic.

Tabela nr. 3

Variațiile activității catalazei sanguine în urma administrării de substanțe hormonale (mg H_2O_2 descompuse la 30 min la 37°C)

Diagnostic	Substanța examinată	Nr. cazurilor	Activitatea catalazei sanguine							
			Valoarea inițială	După administrarea la:						
				15 min		30 min		60 min		4 ore	
			M s	M s	P	M s	P	M s	P	M s	P
Sănătoși (control)	Histamină	20	7,50 0,15	—	—	6,95 0,12	0,001	7,20 0,08	0,001—0,01	7,40 0,1	0,3—0,4
	Adrenalină	15	7,65 0,30	7,10 0,1	0,001	6,85 0,1	0,001	7,25 0,12	0,001—0,01	7,50 0,07	0,05—0,1
	ACTH	15	7,70 0,25	—	—	7,45 0,12	0,05—0,1	7,32 0,1	0,001—0,01	7,65 0,1	0,6—0,7
I. *Catalazemia normală*: gastroenterite, procese reumatice, insuf. cortico-suprarenală etc.	Histamină	25	7,40 0,2	—	—	7,15 0,1	0,1—0,2	7,10 0,08	0,001—0,01	7,30 0,08	0,2—0,3
	Adrenalină	10	7,50 0,15	7,10 0,08	0,001	6,90 0,1	0,001	7,25 0,08	0,001—0,01	7,40 0,1	0,3—0,4
	ACTH	10	7,25 0,3	—	—	7,1 0,08	0,1	7,05 0,07	0,01 —0,02	7,2 0,1	0,6—0,7
II. *Catalazemia crescută*: boală canceroasă	Histamină	50	9,85 0,25	—	—	10,40 0,1	0,001	10,60 0,1	0,001	10,25 0,1	0,001
	Adrenalină	15	10,25 0,35	10,70 0,08	0,001	10,60 0,12	0,01—0,02	10,47 0,1	0,02 —0,05	10,30 0,08	0,6—0,7
	ACTH	25	9,95 0,4	—	—	10,55 0,12	0,001	10,2 0,08	0,001—0,01	10,85 0,12	0,001

Semnificația prescurtărilor: ca în tabela nr. 1

DISCUȚII

Hormonii, ca mesageri chimici ai sistemului endocrin, au un rol fundamental în reglarea și coordonarea metabolismului intermediar și, legat de aceasta, ei asigură o interrelație funcțională hormono-enzimatică [6].

Studiind literatura de specialitate, nu am găsit date referitoare la acțiunea histaminei, adrenalinei și ACTH-ului asupra catalazei sanguine. Între histamină și adrenalină se cunoaște o strînsă legătură funcțională. Histamina stimulează mobilizarea adrenalinei, iar adrenalina echilibrează acțiunea histaminei [10]. De asemenea s-a evidențiat o interrelație între hormonul hipofizar ACTH și adrenalină. Adrenalina stimulează secreția ACTH-ului din hipofiză [11]. Pentru existența unei legături teoretice între adrenalină și catalaza sanguină pledează următoarele date experimentale : oxidarea adrenalinei *in vitro* se produce prin diverși oxidanți, printre care au fost evidențiați peroxidul de hidrogen și numeroase enzime oxidante ; oxidarea *in vivo* a adrenalinei este efectuată chiar de hemine celulare (catalaza ?). Peroxidazele acționează asupra nucleului aromatic din molecula adrenalinei, pe cînd amino-oxidaza asupra catenei laterale [10].

Pe baza cercetărilor noastre, considerăm că histamina, adrenalina și ACTH-ul influențează în mod semnificativ activitatea catalazei sanguine. Felul în care se instalează inhibiția enzimatică nu este complet elucidat. O acțiune directă asupra enzimei poate fi presupusă, întrucît a fost demonstrat de noi că histamina mărește „forța de inactivare" a cianului, dacă acesta a fost în prealabil adăugat la sînge. Acest fapt nu poate fi explicat numai prin aceea că histamina ar produce modificări structurale enzimatice, care ar atrage după sine o acțiune mai pronunțată a cianului.

S-a observat că influența hormonilor studiați asupra activității catalazei sanguine se manifestă în mod diferit, în funcție de valoarea inițială a acesteia din urmă. Cînd activitatea catalazică inițială are valori normale, acești hormoni determină o scădere a ei, pe cînd în cazul unor valori inițiale crescute peste normal are loc, dimpotrivă, o creștere a activității catalazice.

Activitatea catalazei sanguine nu poate fi interpretată numai prin fenomenul de descompunere a perhidrolului, întrucît catalaza mai are o serie de funcții care nu sînt complet elucidate [9]. Metoda de cercetare aplicată de noi însă ne deschide noi perspective în studiul corelațiilor hormono-enzimatice.

CONCLUZII

Activitatea catalazei sanguine a fost modificată în urma acțiunii hormonilor cercetați :

1. *In vitro*, histamina, adrenalina și ACTH-ul reduc în mod foarte semnificativ activitatea catalazei sanguine.

2. Inhibiţia activităţii enzimatice a fost evidenţiată şi prin experienţe efectuate pe şobolani.

3. La oameni, histamina, adrenalina şi ACTH-ul au produs un efect de scădere în activitatea catalazei sanguine la grupa de control şi la indivizii cu diferite îmbolnăviri, la care însă catalazemia iniţială era normală. La persoane cu boala canceroasă, cu catalazemia iniţială crescută, hormonii menţionaţi provoacă o creştere foarte semnificativă a activităţii catalazei sanguine.

4. Datele experimentale din prezenta lucrare confirmă încă o dată faptul că o aceeaşi substanţă poate produce o inhibare sau o activare enzimatică, comportamentul fiind dictat de situaţia actuală în care se află organismul.

Prezentată la redacţie la 28 ianuarie 1965

Spitalul unificat Tîrgu-Mureş,
Laboratorul policlinicii nr. 2

BIBLIOGRAFIE

1. Abderhalden R., *Vitamine, Hormone, Fermente*, Basel, 1953.
2. Büchner Fr., *Der Stoffwechsel*, în *Handb. allg. Path.*, Springer Verl., Viena, 1955.
3. Csontos A., Nüszl L., *Modificarea activităţii catalazei sanguine la şobolani inoculaţi cu tumori*, Rev. med., **X**, *3*, 289 (1964).
4. Csontos A., *Unele relaţii între activitatea catalazei sanguine şi aciditatea sucului gastric*, Med. int., **XVI**, *11*, 1 313 (1964).
5. Csontos A., Birău I., *Acţiunea histaminei asupra catalazei sanguine la bolnavi cu tumori maligne*, Med. int., **XVII**, *3*, 331 (1965).
6. Euler H., *Die Katalasen*, în Chemie der Enzyme, München Verl. Gergmann, 1934.
7. Hoffmann O., *Enzimologie*, Springer Verl., Viena, 1954.
8. Kovach A., *A kisérletes orvos tudomány vizsgálo modszerei*, Akademia, Budapesta, **IV—V**, 1958.
9. Popescu E., *Fiziopatologia fierului. Anemiile hipocrome*, Edit. med., Bucureşti, 1958.
10. Soru E., *Biochimia medicală*, Edit. med., Bucureşti, 1963.
11. Straub F., *Biokémia*, Edit. medicina, Budapesta, 1958.

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 313 – 318 (1965)

MODIFICAREA COMPLECȘILOR METAL-PROTEINE LA PROTEINELE SUPUSE ACȚIUNII RADIAȚIILOR GAMMA *

GH. FURNICĂ

612.398 :612.392.6

Rezumat. — S-a studiat constanta de instabilitate a complexului proteină-Cr pe care îl formează albumina și gamma-globulina neiradiată și iradiată cu radiațiile gamma ale ^{60}Co. Ionul metalic a fost marcat radioactiv prin ^{51}Cr. S-a constatat că stabilitatea complexului este mai mare în cazul gamma-globulinei. În urma iradierii proteinei, stabilitatea complexului format este inferioară aceleia a complexului pe care îl realizează proteina neiradiată. În cazul proteinei iradiate stabilitatea complexului proteină-Cr scade mult mai mult la acțiunea prelungită a apei, comparativ cu cea neiradiată.

Proteinele participă la numeroase procese funcționale și prezintă chiar o importanță structurală în organismul uman și animal [1]. Patologic, ele reflectă prin modificările lor cantitative și calitative capacitatea de reacție specifică sau nespecifică a organismului supus acțiunii externe sau interne a unor agenți fizici, cum pot fi radiațiile ionizante. Denaturarea proteinelor poate fi considerată ca procesul general prin care acționează radiațiile la nivelul molecular în organismul supus acțiunii lor. Alterarea sub acțiunea radiațiilor a metabolismului mineral, a permeabilității „membranelor biologice" a radiosensibilității și activității enzimatice poate fi studiată și parțial explicată prin urmărirea procesului de complexare a ionilor și a stabilității complecșilor proteină-metal [2—5].

Radiațiile ionizante provoacă proteinelor transformări atît imediate, cît și după o anumită perioadă de la încetarea acțiunii lor, transformări care se reflectă prin modificarea unor importante proprietăți fizice, chimice și biologice [6—11].

Biopolielectroliții macromoleculari care conțin funcțiuni ionogene se pot desface, în urma disocierii electrolitice, în macroioni nedializabili și microioni dializabili. Prin separarea acestor două grupe de ioni se va putea evidenția reținerea din amestec, de către macromoleculă, a unor ioni existenți în soluție, reținere care se poate face și sub forma unui complex intern (chelatic). Marcarea ionilor din soluție ca ioni radioactivi

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 3 (1965), în limba franceză.

asigură măsurarea precisă a cantității dializabile de ioni, prin determinări radiometrice. Stabilitatea complexului proteină-metal și variația în timp a stabilității sale poate fi urmărită în condiții optime, măsurîndu-se astfel activitatea soluției care cuprinde ionii dializați.

Stabilitatea în timp a complecșilor proteină-metal explică unele transformări biochimice decelate la distanță de locul de interacțiune între radiații și organismul iradiat, dar mai ales creează premisele unei fundamentări chimice a efectelor biochimice și biologice tardive provocate de radiații. Astfel de efecte s-au constatat la animalele de experiență sau la oamenii supuși iradierii, observîndu-se modificări biochimice și fiziologice după 10—30 de zile de la iradiere și uneori chiar mai tîrziu [12].

În acest sens ne-am propus un studiu asupra variației constantei de instabilitate în timp a complexului proteină-crom. Studiul are în vedere acțiunea hidrolizantă a apei asupra complexului. Urmărind comportarea diferită a complecșilor proteinelor iradiate, în raport cu complecșii proteinelor neiradiate, se poate preciza din acest punct de vedere mecanismul de acțiune al radiațiilor la nivelul molecular al proteinelor.

MATERIAL ȘI METODE

Se admite că macromolecula proteică posedă funcțiuni ionogene și chelatoformatoare, ceea ce îi conferă posibilitatea de a forma complecși interni stabili, cu ionii elementelor tranziționale. Procesul de complexare a ionilor de către proteine are loc în două etape : prin schimb ionic la grupele ionogene (de ex. —COOH) și apoi fixarea coordinativă prin alte grupe (de ex. $-NH_2$) sub forma unui complex intern-chelatic.

Schimbul ionic poate avea loc sub forma următoarei scheme :

$$[BP^{n-} + {}_mH^+] + {}_mMe^+ \rightleftharpoons [BP^{n-} + {}_mMe^+] + {}_mH^+$$

Constanta de instabilitate K_i exprimă stabilitatea complexului prin tendința acestuia de a se disocia și ca atare ea răspunde relației echilibrului dată de legea acțiunii maselor :

$$\frac{[BP]^{3n-} \cdot [Cr^{3+}]^n}{[BP \cdot Cr]} = K_i$$

Marcarea ionului anorganic prin $^{51}Cr^{3+}$ și separarea ionilor radioactivi din soluție de cei reținuți de către proteină, prin dializă, asigură determinarea constantei K_i prin măsurarea radioactivității totale de $^{51}Cr^{3+}$ adăugate și activitatea soluției dializate. În acest caz, constanta K_i reprezintă raportul concentrațiilor $^{51}Cr^{3+}$ din soluție și al concentrațiilor $^{51}Cr^{3+}$ din polimer.

Soluțiilor apoase de 4% albumină și 2% gamma-globulină li s-au adăugat soluții de $^{51}Cr(NO_3)_3$ cu activitate totală de $2{,}65-7{,}24 \cdot 10^{-5}$ mp/min/5 ml. Suspensia obținută după precipitarea parțială a complexului, s-a introdus într-un dializor cu membrană din celofan, fără a schimba soluțiile din instalație, asigurîndu-se astfel stabilirea unui echilibru de concentrație de o parte și de alta a membranei (la +4°C).

Activitatea soluțiilor a fost măsurată periodic la 5, 10, 18, 20, 25, 38, 48, 60, 80 și 100 de ore de la începerea dializei. Măsurătoarea s-a efectuat într-un contor cu scintilații, prevăzut cu cristal de NaI(Tl) în formă de puț, volum 5 ml. Contorul F.H. 421/Z.11 a fost conectat la un numărător de impulsuri F.H.—49.

Determinările au fost efectuate pe soluții de 4% albumină bovină N.B.C. neiradiată și iradiată cu $1,5 \cdot 10^6 r$ la radiațiile gamma ale ^{60}Co. De asemenea, s-au utilizat soluții 2% gamma-globulină bovină (Sigma), neiradiate și iradiate, unele dializate înainte de adăugarea soluției de $^{51}Cr(NO_3)_3$. Dozarea la iradiere s-a efectuat chimic prin $FeSO_4$ [13—15].

Constanta de instabilitate s-a calculat conform relației :

$$\frac{N_s}{N_t - N_s} = K_i$$

unde : N_s = activitatea totală a soluției dializate și
N_t = activitatea totală adăugată proteinei înainte de dializă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din analiza tabelei nr. 1 se desprind cîteva constatări mai importante. Stabilitatea complexului proteină-Cr la acțiunea prelungită a apei diferă la proteinele iradiate în raport cu proteinele neiradiate. Albumina complexată cu Cr pierde o parte din metal datorită hidrolizei prelungite, iar valoarea K_i crește de la $1,7.10^{-2}$ la 0,8. Albumina iradiată cu $1,5.10^6 r$ și apoi complexată cu Cr pare a realiza un complex mai instabil, care pierde mai mult Cr în primele 24—48 de ore de hidroliză, comparativ cu albumina neiradiată. Valoarea K_i crește de la $0,9.10^{-2}$ la 0,8.

Tabela nr. 1

Variația în timp a constantei K_i în mediul apos al complexului proteină-Cr obținută la proteinele iradiate cu $1,5.10^6 r$ și neiradiate

Timp de dializă (ore)	Natura proteinei					
	albumină nedializată în prealabil		globulină nedializată în prealabil		globulină dializată în prealabil	
	neiradiată	iradiată	neiradiată	iradiată	neiradiată	iradiată
10	0,017	0,009	2.10^{-4}	2.10^{-3}	5.10^{-5}	5.10^{-3}
18	0,019	0,010	—	—	—	—
20	0,020	0,063	—	—	—	—
25	0,030	0,74	$3,7.10^{-3}$	$8,0.10^{-3}$	5.10^{-5}	$1,5.10^{-2}$
38	0,15	0,8	—	—	—	—
48	0,7	0,9	—	—	9.10^{-4}	$1,5.10^{-2}$
80	0,7	0,7	—	—	—	—
100	0,8	0,8	$3,7.10^{-3}$	$8,0.10^{-3}$	$3,0.10^{-3}$	$1,5.10^{-2}$

În cazul gamma-globulinei se constată formarea unui complex mai stabil cu Cr. Valoarea K_i este la proteina neiradiată de 2.10^{-4}, iar dacă proteina este dializată înainte de complexare, valoarea K_i este

$5{,}10^{-5}$. În general, complexul albuminic este mai instabil la acțiunea îndelungată a apei decît complexul globulinic.

Comparativ, și la globulină proteina iradiată formează un complex mai instabil decît proteina neiradiată, valoarea K_i crește în timp mult mai repede. Cu toate acestea, valoarea K_i la complexul globulină-Cr (proteină iradiată) crește de la 2.10^{-3} la 8.10^{-3}. Dacă proteina a fost dializată în prealabil valoarea constantei crește de la 5.10^{-3} la $1{,}5.10^{-3}$ după 48 de ore; menținîndu-se valoarea practic constantă și după 100 de ore. La albumină, modificarea valorii K_i este mai accentuată, ceea ce denotă că la globulină prezența Cr determină o stabilizare a proteinei (tabela nr. 1). Se pare că pe această cale albumina este evidențiată ca proteină mai radiosensibilă comparativ cu globulina. Cu toate acestea, valoarea K_i a complexului proteină-Cr, în raport cu complexul proteină-iradiată-Cr, este mai diferențiată la globulină după 10 ore, indicînd în felul acesta o instabilitate mai mare a complexului proteinei respective iradiate.

Pentru compararea stabilității compușilor complecși proteină-Cr, în care proteina poate fi albumină sau globulină, este necesar calculul raportului între constanta de instabilitate a complexului proteină-Cr (K_p) și constanta de instabilitate a complexului proteină-iradiată-Cr (K_{pi}). Rezultatele acestui calcul sînt date în tabela nr. 2.

Tabela nr. 2

Modificarea raportului $K_p : K_{pi}$ în timpul hidrolizei

Soluția de proteină	Valoarea raportului K_p/K_{pi}							
	10 ore	18 ore	20 de ore	25 de ore	38 de ore	48 de ore	80 de ore	100 de ore
Albumină nedializată	1,89	1,90	0,31	0,04	0,18	0,87	1,00	1,00
Globulină nedializată	0,10	—	—	0,46	—	—	—	0,46
Globulină dializată	0,01	—	—	0,0033	—	0,06	—	0,2

Faptul că gamma-globulina nedializată pierde mai mult $^{51}Cr^{3+}$ la dializa de 24 de ore, în raport cu globulina dializată, indică existența probabilă în macromoleculă a unor fracțiuni dializabile.

Din analiza rezultatelor inserate în tabela nr. 2 se conturează cîteva idei, și anume: stabilitatea complexului albumină-iradiată-Cr scade mult mai repede în primele 24 de ore de dializă și hidroliză, în timp ce la complexul globulină-iradiată-Cr stabilitatea este relativ mai ridicată în această perioadă, ea scăzînd în mod deosebit numai în primele 24 de ore de hidroliză. În general, complexul proteinei iradiate-Cr este mai stabil pentru albumină, deoarece raportul K_p/K_{pi} oscilează între valorile 0,18 și 1,90, cu excepția situației de la 25 ore. La globulină, acest raport variază în cazul proteinei nedializate în prealabil între 0,10 și 0,46, iar dacă proteina este dializată în prealabil raportul oscilează între $3{,}3.10^{-3}$ și 0,2.

Interesant de menționat este faptul că la globulina dializată în prealabil complexul proteină-Cr este mai stabil, iar acțiunea hidrolizantă a apei este mult mai slabă în primele 24 de ore, ea manifestîndu-se după 24—48 de ore. La 100 ore de hidroliză, stabilitatea complexului nu mai depinde de dializa prealabilă a proteinei (tabela nr. 1). Cu totul alta este situația complexului proteină iradiată-Cr, cînd stabilitatea scade mult mai repede în cazul globulinei dializate în prealabil (tabela nr. 2). Aceste constatări sugerează ipoteza că fracțiunile macromoleculare grele, nedializabile, formează complecși mai instabili, comparativ cu fracțiunile dializabile. De menționat că după 100 de ore de dializă stabilitatea este practic egală, ceea ce ar susține ipoteza formării prin hidroliză a unor fracțiuni mai ușoare, dializabile, cauzele hidrolizei neputînd fi încă explicate.

Prin urmare, radiațiile ionizante afectează în mod deosebit fracțiunile macromoleculare mari, după cum rezultă din faptul că stabilitatea complexului proteină-iradiată-Cr scade mai repede în cazul globulinei dializată în prealabil (tabelele nr. 1 și 2).

CONCLUZII

1. Stabilitatea complexului proteină-Cr la acțiunea hidrolizantă prelungită a apei este mai mică la albumină comparativ cu gamma-globulină. Complexul metal-proteină este în general mai stabil în cazul globulinei, iar în cazul albuminei efectul hidrolizant este mai accentuat după 24 de ore.

2. Instabilitatea la hidroliză este mai crescută după 24 de ore de contact și dializă în cazul complexului gamma-globulină-Cr la fracțiunile macromoleculare grele.

3. Modificarea în timp a stabilității complecșilor proteină iradiată-Cr atestă existența în macromolecula iradiată a unor procese chimice care se manifestă chiar după o anumită perioadă de la încetarea acțiunii radiațiilor.

4. Stabilitatea complecșilor metal-proteine poate constitui o nouă metodă de studiu a comportării proteinelor iradiate și care în cazul de față demonstrează o radiosensibilitate mai accentuată la gamma-globuline în raport cu albumina, sensibilitatea fiind mai mare la fracțiunile macromoleculare grele.

Prezentată la redacție la 19 martie 1965

Laboratorul de radiații al Institutului de igienă și protecția muncii, București

BIBLIOGRAFIE

1. Gh. Mogoș, *Proteinele*, Edit. medicală, București, 1964.
2. N. T. Claire, D. Nachmanson, *Ion transport across membranes*, Acad. Press, New York, 1954.

3. A. KLEINZELLER, A. KATYK, *Membrane transport and metabolism*, Acad. Press, New York, 1961.
4. H. ALTMAN, G. STERLINK, K. KAINDL, *Beeinflussung der Strahlenrezistenz durch Metallionen*, Atompraxis, **7**, 7, 255 (1963).
5. E. FREDERICQ, *Complexes métalliques et catalyse enzymatique*, Ind. Chim. Belge, **XXXV**, 5, 511 (1960).
6. GH. FURNICĂ, MARIA FURNICĂ, *Date experimentale asupra mecanismului actinoprotecției medicamentoase*, Analele rom.-sov., Edit. Acad. R.P.R., seria chimie, **II**, 46 (1961).
7. F. BOVEY, *The effects of ionizing radiation on natural and synthetic high polymers*, Interscience Publishers, New York, 1958.
8. D. E. LEA, *Actions of radiations on living cells*, Cambridge Univ. Press, London, 1946.
9. W. M. DALE, J. V. DAVIES, C. W. GILBERT, *The kinetics and specificities of deamination of nitrogenous compounds by X-radiations*, Biochem. J., **45**, 93 (1949).
10. Internat. Atomic Energy Agency, *Biological effects of ionizing radiation at the molecular level*, Vienna, 1962.
11. A. HIRSCHMAN, S. H. SHAPIRO, *Effects of iradiation in vitro on calcifyng mechanism of epiphyseal cartilage*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **104**, 659 (1960).
12. MARIA FURNICĂ, GH. FURNICĂ, *Studii biochimice asupra procesului de radioprotecție*, St. cerc. biochim., 5, 251 (1962).
13. W. M. DALE, J. V. DAVIES, C. W. GILBERT, *The determination of glycinely-α-radiation from the desintegration of boron in a nuclear reactor*, Biochem. J., **45**, 543 (1949).
14. A. DRĂGUȚ, G. IOANID, I. DRIMUȘ, *Inițierea reacțiilor de oxidare cu ajutorul radiațiilor radioactive*, Revista de chimie, **X**, 589 (1959).
15. GH. FURNICĂ, A. DIMITRIU, *Studiul acțiunii radiațiilor asupra polielectroliților macromoleculari. IV. Degradarea radiolitică a proteinelor*, St. cerc. biochim., **6**, 411 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3,319 – 324 (1965)

BIOCHIMIA LICHIDULUI FOLICULAR *

ALICE KAPRI ŞI H. ARAŢEI

577.1

Rezumat. — Se analizează din punctul de vedere al compoziţiei chimice lichidul folicular şi serul sanguin de la suidee.

Pe baza indicilor biofizici şi biochimici stabiliţi se ajunge la concluzia că lichidul folicular este asemănător în ceea ce priveşte compoziţia chimică cu serul sanguin, fapt ce pledează în favoarea ipotezei transudatului sanguin. Datele biochimice neconcordante sugerează un proces de elaborare la nivelul tecilor foliculului Graaf, proces interpretat ca fiind legat de necesitatea formării unor complexe care să permită atît înmagazinarea hormonilor ovarieni cît şi vehicularea lor către organul receptor sau circuitul sanguin.

Studiile întreprinse de diferiţi autori demonstrează diversitatea opiniilor cu privire la geneza lichidului folicular.

Luscka (1858) şi Waldeyer (1870) (cit. după [4]) consideră lichidul folicular ca fiind un transudat al vaselor sanguine, iar proteinele ca provenind din transformarea proteinelor citoplasmei celulelor granuloase.

Această teorie este împărtăşită de Zondek şi Ascheim [19], cu rezerva că lichidul folicular ar putea fi în acelaşi timp un produs de elaborare al celulelor tecii interne.

Selye [16] şi apoi Sainton şi Simmonet [17], emit ipoteza că lichidul folicular ar reprezenta o funcţie a celulelor granuloasei.

Studiul electroforetic al proteinelor lichidului folicular la bovidee determină pe Caravaglios şi Cilotti [4] să afirme că acesta este un transudat sanguin filtrat la nivelul tecii interne. În sprijinul acestei teorii, autorii găsesc la o bovină bolnavă de tuberculoză pulmonară proteinele şi glicoproteinele scăzute atît în serul sanguin cît şi în lichidul folicular.

Short [18] dozează steroizii în lichidul folicular şi ţesutul luteal şi ajunge la concluzia că în ovar există două tipuri de celule capabile să producă steroizi. Un tip constituit din celulele tecii interne cu capacitatea de a produce estrogenii prin convertirea progesteronei în estradiol *17*-beta şi, al doilea tip, celulele luteinizate care produc progesterona; cercetările făcute au demonstrat că corpul luteus produce cantităţi extrem

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **2**, *3* (1965), în limba franceză.

de mici de *17*-alfa-hidroxiprogesteronă, faţă de progesteronă şi este complet lipsit de androstendionă, epitestosteronă, *19*-norandrosteronă, estronă, estradiol *17*-beta şi hidroxiestradiol *17*-beta. Aceasta a sugerat autorului ideea că celulele luteale au o activitate *17*-hidroxilantă mică şi că sînt incapabile de a scinda lanţul cu C_{21}.

Mîrza [12] [13] susţine teoria „echivalentului vitelin", arătînd că lichidul folicular ca şi vitelusul ovulelor unor specii de vertebrate se formează din substanţe difuzate din sînge şi modificate în parcursul lor, în special la nivelul tecii interne, al membranei reticulare şi al epiteliului folicular.

Literatura privind lichidul folicular arată că originea şi natura acestuia au fost relativ puţin studiate, cercetările adresîndu-se în special conţinutului în hormoni.

Un studiu biochimic complex al lichidului folicular, ca şi al formelor pe care pot să le îmbrace interrelaţiile dintre hormonii ovarieni şi ceilalţi componenţi organici din lichid şi al vehiculării lor nu l-am găsit semnalat în literatura consultată.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările biochimice s-au executat pe 150 de animale. Pentru fiecare determinare s-au întrebuinţat serul sanguin de la 10 scroafe sacrificate şi lichidul folicular extras din ovarele aceloraşi animale. Pentru stabilirea valorilor medii procentuale fiecare determinare a fost repetată pe 15 loturi.

Serul sanguin şi lichidul folicular au fost centrifugate timp de 20 de minute la 3 000 g

În lichidul folicular şi serul sanguin s-au determinat următorii indici biofizici şi biochimici: densitate, umiditate, indice de refracţie, vîscozitate, sodiul, potasiul, calciul, fierul, clorurile, glucoza, colesterolul, lipidele totale, proteinele totale, azotul total, azotul polipeptidic, polipeptidele, fracţiunile proteice şi cenapsele glico- şi lipoproteice.

Metodele folosite pentru determinarea acestor indici sînt incluse în tabela nr. 1.

REZULTATE

Lichidul folicular a fost studiat atît din punct de vedere calitativ cît şi cantitativ, în raport cu componentele organice şi anorganice din serul sanguin.

Valorile medii procentuale stabilite pentru diferiţii indici biofizici şi biochimici din serul şi lichidul folicular sînt consemnate în tabela nr. 1. Din compararea acestor rezultate reiese că lichidul folicular este un produs complet, bogat în substanţe organice şi anorganice, asemănător din punctul de vedere al compoziţiei chimice cu serul sanguin.

Majoritatea datelor obţinute arată o concordanţă între lichidul folicular şi serul sanguin în ceea ce priveşte concentraţia în care se găsesc unii componenţi chimici, cum sînt: azotul total, azotul polipeptidic, polipeptidele, glucidele, cenapsele glicoproteice, unele fracţii proteice,

Tabela nr. 1

Valoarea medie a constantelor biofizice şi biochimice determinate în lichidul folicular şi serul sanguin de suidee

Indicele determinat	Lichid folicular		Ser sanguin		Metoda
	Medie	Abatere standard	Medie	Abatere standard	
I. *Constante biofizice*					
Densitatea	1,029	±0,0002	1,026	±0,0004	gravimetrică
Umiditatea	914,40	±0,50	919,40	±0,26	,,
Vîscozitatea	2,31	±0,11	1,95	±0,03	capilară
Indicele de refracţie	56,31	±0,54	54,90	±0,34	refractometrică
II. *Constante biochimice*					
Na^+	24,9	±1,47	26,3	±2,70	colorimetrică [8]
K^+	2,51	±0,53	1,75	±0,25	volumetrică [9]
Ca^{2+}	1,17	±0,15	1,09	±0,13	,,
Fe^{3+}	0,0029	±4,47	0,0037	±4,41	colorimetrică (cit. după [7])
Sr^{3+}	urme		urme		spectrografică
Cu^{2+}	urme		urme		,,
Cl^-	34,9	±4,04	35,4	±3,74	volumetrică (cit. după [7])
Glucoză	1,16	±0,053	1,11	±0,13	,, ,,
Colesterol	0,504	±0,086	0,409	±0,067	spectrofotometrică [1]
Lipide totale	3,9	±0,21	3,19	±0,26	gravimetrică
Proteine totale	71,20	±0,97	69,10	±0,54	refractometrică
Azot total	12,34	±0,14	11,45	±0,085	Kjeldahl
Azot polipeptidic	0,49	±0,044	0,53	±0,02	,,
Polipeptide	3,07	±0,025	3,31	±0,12	,,
Fracţiuni proteice					electroforeza pe hîrtie
Serum-albumine	40,63	±1,5	38,49	±0,97	Proteinele s-au colorat cu albastru de
α-globuline	19,40	±1,05	22,24	±1,2	bromfenol. Eluţie cu NaOH 0,1N.
β-globuline	20,08	±1,1	15,16	±1,2	Extracţiile s-au citit la 600 mμ.
γ-globuline	20,90	±1,2	23,59	±1,2	
Cenapse lipoproteice					
Kilomicroni (fracţiunea C)	0	0	27,11	±1,4	Lipoproteinele s-au colorat cu negru
β-lipoproteine (fracţiunea *L*)	36,20	±1,9	57,41	±1	Sudan. Eluţie cu acid acetic-etanol
α-lipoproteine (fracţiunea *R*)	63,80	±1,8	20,45	±1,2	1 : 3. Extincţiile s-au citit la 600 mμ.
Cenapse glicoproteice					
Serum-glicoproteine	17,57	±0,66	16,80	±0,58	Glicoproteinele s-au colorat după teh-
α-glicoproteine	42,95	±0,53	42,21	±0,44	nica Koiw (cit. după [6] şi [15]). Eva-
β-glicoproteine	22,22	±1,32	23,15	±0,70	luarea cantitativă s-a făcut după teh-
γ-glicoproteine	16,73	±0,67	16,25	±0,43	nica Laurell şi Skoog (cit. după [11]).

substanţele anorganice şi unele constante biofizice ca umiditatea şi densitatea.

Ceilalţi indici biofizici şi biochimici determinaţi în serul şi lichidul folicular sînt neconcordanţi. Astfel, vîscozitatea, lipidele totale, colesterolul, fracţiunea β-globulinică şi α-lipoproteinele se găsesc în concentraţie mai mare în lichidul folicular decît în serul sanguin.

Lipidograma lichidului folicular este total diferită de aceea a serului sanguin. În lichidul folicular cenapsele β-lipoproteice (fracţiunea L) prezintă valori scăzute, alfa-lipoproteinele (fracţiunea R) sînt mult crescute faţă de cenapsele corespunzătoare din serul sanguin, iar kilomicronii lipesc total (fracţiunea C).

DISCUŢII

Rezultatele concordante în ceea ce priveşte concentraţia unora din componenţii lichidului folicular şi ai serului sanguin pledează pentru ipoteza transudatului sanguin modificat numai prin procesul de hormonogeneză.

Substanţele din sînge traversează mai multe filtre celulare şi acelulare. Concepţia actuală asupra structurii celulare admite existenţa unui strat molecular limitant, constituit din complexe lipoproteice. Moleculele mici, cu grupări polare puţine, trec uşor prin pătura lipidică a membranei, în timp ce moleculele mari, de tipul colesterolului sau al proteinelor, nu pot trece prin simplă difuziune.

Ţinînd seama de unul din atributele membranei — permeabilitatea selectivă — cît şi de faptul că la nivelul celulei pot avea loc o serie de sinteze, existenţa datelor neconcordante apare justificată.

Concentrarea mare a lipidelor totale din lichidul folicular demonstrează un proces de elaborare la nivelul păturilor celulare, cu atît mai mult cu cît cercetările histochimice au pus în evidenţă existenţa esterilor de colesterol şi a cetosteroizilor [2] [3] alături de fosfataza alcalină şi acidă [5], de succin-dehidrază şi de steroid-3-beta-ol dehidrogenază [10]. Conţinutul crescut de lichide totale ar fi legat în acest caz de antrenarea în cavitatea foliculară a produselor finale de sinteză, estrogenii.

Creşterea colesterolului în lichidul folicular pare un paradox faţă de afirmaţia că acesta nu poate trece prin simplă difuziune la nivelul filtrelor celulare, ca şi faţă de faptul că o parte din el este consumat pentru sinteza hormonilor steroizi. Anomalia se poate explica prin aceea că reacţia Lieberman-Burchard nu este specifică colesterolului, fiind interferată şi de alţi steroizi.

Creşterea concentraţiei β-globulinelor din lichidul folicular apare ca o necesitate determinată de formarea complexelor hormonoproteice, în vederea vehiculării acestora către organele receptoare sau ficat.

Existenţa cantităţilor mari de estrogeni explică scăderea marcată a β-lipoproteinelor şi creşterea α-lipoproteinelor din lichidul folicular.

Se citează în literatură [14], cu privire la distribuirea lipoproteinelor după administrarea de estrogeni, o inversare a valorior lipoproteice serice

atît la bărbaţi cît şi la femei, în sensul scăderii β-lipoproteinelor şi creşterii α-lipoproteinelor.

Existenţa datelor neconcordante conduc la presupunerea că la nivelul tecii foliculului Graaf, pe lîngă procesul de dufuziune a unor substanţe din sînge, are loc şi un proces de elaborare.

Este greu de afirmat dacă acest proces de elaborare se petrece numai în teaca internă sau numai în granuloasă, deoarece atît teaca internă cît şi celulele foliculare au un aparat mitocondrial dezvoltat.

Cercetările histochimice referitoare la fosfatază, colesterol şi esteri de colesterol indicînd o concentrare mai mare a acestora în teaca internă, se poate presupune că activitatea de elaborare este mai intensă la acest nivel, fără a se exclude posibilitatea ca acest proces să aibă loc şi în granuloasă.

Datele noastre cu privire la fracţiile proteice şi cenapsele lipoproteice pledează pentru concepţia că distribuţia proteinelor şi lipidelor în interiorul lichidului folicular, ca şi interrelaţiile dintre ele se modifică în sensul găsirii unei forme care ar permite vehicularea hormonilor o dată formaţi către organele receptoare şi circuitul sanguin.

Credem că modificările semnalate se fac atît în raport cu funcţiile speciale ale lichidului folicular, de înmagazinare a hormonilor ovarieni, cît şi cu necesitatea vehiculării acestora către curentul sanguin.

Prezentată la redacţie la 4 martie 1965

Secţia de biomorfologie
Academia R. S. România, Filiala Iaşi

BIBLIOGRAFIE

1. Arateı H., Mironeanu T., *Cîteva date chimice şi fizico-chimice asupra lichidului folicular la suidee*, St. cerc. şt. med., Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, *2*, 297—303 (1960).
2. Arateı H., Dimitriu C., Saiciuc C., *Histochimia colesterolului în cursul evoluţiei foliculilor ovarieni la suidee*, St. cerc. embriol. şi citol., seria citologie, **2** (1964).
3. Arateı H., Gheorghiu T., *Detectarea histochimică a cetosteroizilor în organele de suidee*, Morfol. norm. şi patol., **4**, 367—369 (1963).
4. Caravaglios R., Cilotti R., *A study of the proteins in the folicular fluid of the cow*, J. endocrin., **15**, 273—278 (1957).
5. Dimitriu C., Arateı H., Saiciuc C., *Studiu histochimic al activităţii fosfomonoesterazelor nespecifice acide şi alcaline în corticala ovarului de suidee*, St. cerc. embriol. şi citol., seria citologie, **1**, 83—88 (1964).
6. Fine J. M., Groulade M., Saint P., R. J. Tizzane, *Apport de la méthode cantitative à la connaissance de la physiologie des protéines glyco- et lipoproteines chez l'homme et l'animal*, Biol. méd., 6, 610 (1956).
7. Georgescu P., Păunescu E., *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Edit. medicală, Bucureşti, 1960.
8. Ghimicescu Gh., Kapri Alice, *Microdozarea colorimetrică a sodiului în material biologic*, St. cerc. ştiinţ., Acad. R.P.R., Fil. Iaşi, **2**, 314—319 (1954).
9. Ghimicescu Gh., Musteaţă C., *Contribuţii la microdozarea potasiului în sînge*, St. cerc. ştiinţ., Acad. R.P.R., Fil. Iaşi, **2**, 306—311 (1954).
10. Ikonen M., Niemi M., Personen S., Timonen S., *Histochemical localisation of four dehydrogenase systems in human ovary during the menstrual cycle*, Acta endocrin., 35 (1961).

11. Kosliukovskaia O. M., Jukov A. V., *Voprosî mediţinskoe himii*, tom VIII, Vîpusk 6, 1961, p. 642.
12. Mîrza V. D., *Histophysiologie de l'ovogenèse*, Coll. Act. Scient. et ind., Ed. Herman, Paris, 1938, p. 751.
13. Mîrza V. D., Kapri A., Araţei H., Dimitriu C., *La biologie et la composition du liquide foliculaire*, Ve Symposium Intern. de Histologie, Sofia, 30 oct. 1963.
14. Putman W. F., *The plasma protein*, vol. II, Edit. F. Putman, 1947.
15. Romani J. D., *La recherche et l'évaluation des glycoproteines du serum à l'aide de l'électrophorese sur papier*, Presse méd., **62**, 1579 (1954).
16. Selye H., *Textbook of Endocrinology*, Printed in Canada, 1947, p. 339.
17. Sainton P., Simmonet H., *Endocrinologie clinique, thérapeuthique et experimentale*, t. II, Masson, 1952.
18. Short V., *Steroids in the folicular fluid and the corpus luteum of the mare. A „two cell-type" theory of the ovarian steroid synthesis*, J. endocrin., **24**, 59—63 (1962).
19. Zondek B., Ascheim S., *Zur Funktion des Ovarium. Die Enstehung Folikulsafter*, Klin. Wschr., **5**, 400—404 (1926).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 325 – 334 (1965)

GLICOLIZA AEROBĂ, FOSFORILAZA *a* ŞI ALDOLAZA ÎN CURSUL CONTRACŢIEI MUSCULARE *

DINU TĂNĂSESCU

612.744:612.396.2

Rezumat. — S-a făcut determinarea glicolizei în condiţii de incubare aerobă şi în prezenţa unuia din următoarele substrate: glicogen, glucozo-*6*-fosfat, fructozo-*6*-fosfat şi fructozo-*1,6*-difosfat. În aceste condiţii, acumularea acidului lactic este dependentă atît de durata de stimulare, cît şi de substratul adăugat.

Activitatea fosforilazei *a* după o creştere netă (15—30 sec stimulare) ajunge la valorile de bază ale muşchilor martori stimulaţi 1 min, şi scade apoi sub aceste valori prin prelungirea duratei de stimulare.

Valorile activităţii aldolazei cresc după stimulări de 30—60 sec, revenind la nivelul activităţii din muşchii martori după durate mai lungi de stimulare.

Rezultă că şi această enzimă are un rol în reglarea proceselor din cursul contracţiei musculare şi se emite ipoteza că fosforilaza *a* reglează procesele glicolitice care au loc în primele secunde ale contracţiei, în timp ce fosforilaza *b* le reglează pe acelea din muşchii supuşi unui efort prelungit.

Sistemul glicolitic muscular are un rol deosebit în refacerea compuşilor macroergici consumaţi în cursul efectuării unui lucru mecanic [1]. Cu toate acestea, nu este clarificată încă legătura dintre lucrul mecanic efectuat de muşchii care se contractă şi modul de declanşare a reacţiilor chimice prin care este furnizată energia necesară [2].

Lucrări recente [3—5] au arătat că în cursul şi după contracţiile musculare sistemul glicolitic, care acţionează ca un tot unitar, este reglat de cîteva mecanisme enzimatice care pot să activeze sau să încetinească, unele reacţii de degradare a compuşilor intermediari formaţi.

Pînă în prezent se cunoaşte că degradarea glicogenului este accelerată în primele secunde ale contracţiei prin creşterea activităţii fosforilazei *a* [2], [6]. În acelaşi timp se constată şi o creştere a activităţii fosfofructokinazei [5], care are în general un rol de limitare a vitezei de degradare a compuşilor fosforici formaţi [7—9].

Imediat după încetarea stimulărilor, activitatea enzimatică a fosforilazei *a* şi a fosfofructokinazei revine la nivelul normal [3], [5], [6].

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 3, (1965), în limba engleză.

Acest fapt demonstrează prezența unor mecanisme enzimatice speciale de activare și inactivare, declanșate în timpul stimulărilor.

Într-o lucrare anterioară [10] s-a arătat că în mușchii gastrocnemieni de broască are loc o acumulare bruscă a acidului lactic după efectuarea unei serii scurte de contracții. Această observație, care concordă cu acelea obținute prin studiul altor componente ale sistemului glicolitic [4], [5], demonstrează relația strînsă care există între procesele contractile și glicoliză.

Pentru a se preciza modul în care au loc aceste procese glicolitice, în lucrarea de față s-a studiat rata de formare a acidului lactic în omogenate de mușchi stimulați un timp variabil (1, 3, 5 min), în prezența unor substrate diferite adăugate mediului de reacție. Aceste substrate au fost glicogenul, glucozo-*6*-fosfatul, fructozo-*6*-fosfatul și fructozo-*1*, *6*-difosfatul. În același timp s-a urmărit atît variația activității fosforilazelor *a* și *b* cît și a aldolazei, în urma unor stimulări scurte (15, 30 și 60 sec) sau a unor stimulări prelungite (3, 5 min).

MATERIALE ȘI METODE

M e t o d o l o g i a. Experiențele au fost efectuate pe mușchi gastrocnemieni de broaște (*Rana ridibunda*), capturate în perioada noiembrie-martie. Mușchii au fost prelevați cu grijă, pentru evitarea oricărui traumatism, și păstrați timp de 15—30 min între două hîrtii de filtru umectate cu ser fiziologic (7‰), pentru revenirea lor la un echilibru biochimic.

S-au efectuat stimulări electrice cu un generator de impulsuri la 0,2 mA, cu 5 impulsuri pe secundă. Durata unui impuls a fost de 5 mS, iar pauza dintre două impulsuri de 200 mS. S-au efectuat contracții izotonice.

După trecerea timpului dorit de stimulare, mușchiul a fost înghețat rapid (maximum 2—3 sec) cu azot lichid și mojarat. După eliminarea minuțioasă a țesutului conjunctiv, praful de mușchi înghețat a fost introdus și apoi cîntărit rapid în eprubete de centrifugă de 10 ml, răcite în prealabil cu azot lichid. În aceleași eprubete s-a făcut o omogenizare la 2 000 rot/min cu un mediu care a variat în funcție de analiza efectuată. Centrifugările au fost efectuate la 2°C (Janetzki K 13).

Toate determinările au fost efectuate față de mușchii pereche martor, care nu au fost stimulați electric.

G l i c o l i z a. Praful de mușchi înghețat (probe de 0,15—0,25 g) a fost omogenizat timp de 30 sec în tampon Tris-HCl, pH 7,4. Omogenatele au fost păstrate pînă în momentul determinării la 3°C.

Determinarea glicolizei a fost efectuată aerob, cu agitare, la 30°C, într-un mediu de reacție cu următoarea compoziție [11] : difosfopiridin-nucleotid (NAD) 0,50 mM, ATP 1 mM, nicotinamidă 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 10 mM, tampon Tris-HCl pH 7,4 50 mM, tampon fosfat de K pH 7,4 1 mM, iar ca substrat 5 mM din : glucozo-*6*-fosfat, fructozo-*6*-fosfat, fructozo-*1*,*6*-difosfat și glicogen 2%. Volumul final a fost de 3 ml.

După o prealabilă preincubare a mediului de reacție timp de 10 minute, procesul a fost declanșat prin adăugarea omogenatului total, preincubat separat (0,5 ml din omogenatul total, echivalent cu aproximativ 45 mg țesut umed). Reacția a fost oprită după 30 min de incubare, cu 1 ml acid tricloracetic 20%. Acidul lactic a fost determinat cu metoda Barker-Summerson [12], în supernatantul obținut după o centrifugare la 4 000 rot/min.

Fosforilaza a fost dozată cu ajutorul metodei lui Danforth [6], cu cîteva modificări [13].

Iniţial s-a făcut un omogenat 5% cu probe de praf de muşchi (între 0,10—0,20 g), omogenizate 15 sec la —35°C cu glicerină 60% care conţinea florură de Na 20 mM şi EDTA 1 mM pH 6,1. După o încălzire la +3°C, prin păstrarea eprubetelor într-un vas cu apă şi gheaţă, omogenatul a fost diluat cu următorul mediu: cisteină 20 mM, NaF 20 mM, EDTA 1 mM şi β-glicerofosfat de Na 20 mM pH 6,1. Diluţia finală a omogenatului a fost de 1/150 în cazul fosforilazei *a*, respectiv 1/300 în cazul fosforilazei *b*.

Activitatea fosforilazelor a fost determinată în următorul mediu de reacţie: 0,2 ml enzimă diluată şi 0,1 ml glicogen 2%. După o preincubare de 15 minute, reacţia a fost declanşată prin adăugare de 0,1 ml glucozo-*1*-fosfat 66 mM cu *5'*-AMP 5 mM. Reacţia a fost oprită cu 5 ml molibdat acid (5 g molibdat de amoniu şi 25 ml acid sulfuric concentrat la 1 000 ml apă [14]). Fosforul anorganic a fost determinat, după centrifugare, cu metoda Fiske-Subbarow [15].

Fosforilaza *a* a fost determinată în acelaşi fel, fiind însă omis *5'*-AMP. Diluţia la care s-a lucrat fosforilaza *a* a fost suficientă pentru a nu interfera *5'*-AMP endogen [6].

În probele martor incubate în acelaşi mediu, dar fără glicogen, respectiv fără glucozo-*1*-fosfat, activitatea fosfatazelor este nulă.

Activitatea fosforilazei *a*, dozată în absenţa *5'*-AMP, a fost exprimată în procente din activitatea totală (fosforilaza *a* + fosforilaza *b*), determinată în prezenţa *5'*-AMP. Activitatea fosforilazelor reprezintă μmoli P_i/g ţesut umed, eliberaţi într-un minut de incubare.

Aldolaza a fost determinată după metoda lui Sibley şi Lehninger [16], cu modificările lui Srivastava şi Berlinguet [17]. Pulberea de muşchi (probe între 0,1 şi 0,2 g) a fost omogenizată 30 sec în tampon Tris-HCl pH 8,6. Omogenatele au fost păstrate pînă în momentul determinării la 3°C. Enzima a fost determinată prin incubare 15 min la 37°C în următorul mediu de reacţie: 0,2 ml enzimă diluată (omogenat 0,1%), 1,4 ml tampon Tris-HCl pH 8,6, 0,2 ml hidrazină 0,56 M adusă la pH 8,6 cu NaOH 40%, şi 0,2 ml fructozo-*1,6*-difosfat 0,05 M. Reacţia a fost oprită la temperatura camerei cu 2 ml acid tricloracetic 10%. După centrifugare, la 1 ml supernatant s-a adăugat 1 ml NaOH 0,75 M şi s-a lăsat 10 min la temperatura camerei. După o incubare de 1 oră la 37°C cu 1 ml *2,4*-dinitro-fenil-hidrazină 0,1% în HCl 2 M, s-au introdus 7 ml NaOH 0,75 M. S-a filtrat, iar intensitatea culorii violete formate s-a fotometrat după 10 min la 540 mμ. Martorul s-a preparat în acelaşi fel, doar că substratul s-a adăugat după acidul tricloracetic.

Activitatea aldolazei a fost calculată prin raportarea la triozo-fosfaţii alcalo-labili formaţi în aceleaşi condiţii, rezultatele fiind exprimate în unităţi S-L pe mg ţesut umed [15].

Materialele întrebuinţate. Difosfopiridin-nucleotidul, fructozo-*6*-fosfatul (sarea de bariu), fructozo-*1,6*-difosfatul (sarea de bariu), ATP, glucozo-*1*-fosfatul (sarea de potasiu) au fost de proveniență N.B.C. Glucozo-*6*-fosfatul (sarea de bariu) tetrahidratat a fost obţinut de la firma Fluka, iar glicogenul de la firma Merck. Toate celelalte chimicale au fost produse analitice. Sarea de bariu a esterilor fosforici a fost transformată în sarea de sodiu prin dizolvare în HCl 0,5 N şi precipitarea bariului cu o soluţie echivalentă de sulfat de sodiu.

REZULTATE

Prin incubarea timp de 30 min a omogenatelor obţinute de la muşchi stimulaţi (1, 3 şi 5 minute), într-un mediu de reacţie în care nu s-a adăugat nici un substrat, se observă că după o perioadă iniţială de lag are loc o

creştere a acidului lactic. Această creştere este mai marcată în cazul omogenatelor de muşchi stimulaţi 5 minute. Comparativ cu datele obţinute în acelaşi mediu, dar fără nici un substrat, prin adăugarea în mediul de reacţie a glicogenului, formarea acidului lactic este net crescută şi este proporţională cu timpul de stimulare (fig. 1).

Prin incubarea supernatantului obţinut în urma centrifugării omogenatului timp de 30 min la 5 000 *g* la 2°C, se produce o scădere a acumulării acidului lactic faţă de aceea obţinută cu omogenatul total, păstrîndu-se totuşi linearitatea faţă de timpul de stimulare (fig. 2). Se poate presupune că activitatea glicolitică a supernatantului scade fie datorită lipsei unor

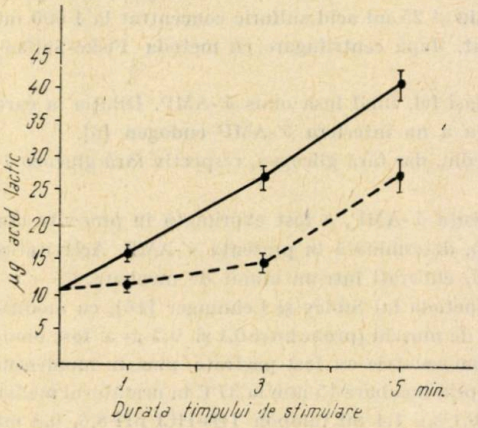


Fig. 1.—Formarea acidului lactic prin incubarea în condiţii aerobe a omogenatelor de muşchi stimulaţi timp de 1, 3 şi 5 min (compoziţia mediului de incubare a fost descrisă în capitolul „Materiale şi metode").
●—● Formarea în prezenţa glicogenului ca substrat.
●- -● Formarea în lipsa oricărui substrat
Barele verticale reprezintă erorile standard ale mediei obţinute din 5 experienţe.
Valorile reprezintă μg acid lactic/g ţesut umed după 30 min incubare.

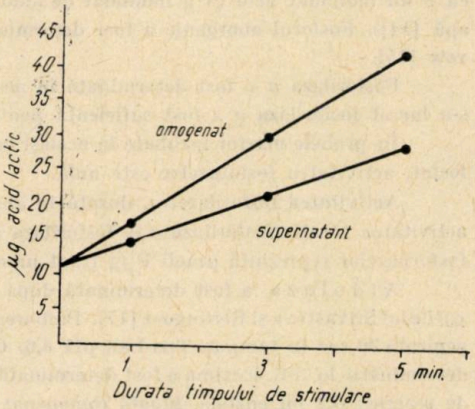


Fig. 2.—Formarea acidului lactic în prezenţa ca substrat a glicogenului, cu omogenatul total şi cu supernatantul obţinut după o centrifugare la 5 000 *g*.
Valorile reprezintă μg acid lactic/g ţesut umed după 30 min incubare.

cofactori, fie prezenţei într-o cantitate limitată a unor sisteme enzimatice ce se găsesc integral în omogenatul total. Acest fapt ne-a determinat ca în toate experienţele ulterioare să lucrăm numai cu omogenatul total.

Pentru a se putea urmări mai bine procesele glicolitice care au loc în cursul stimulărilor, în mediul de reacţie au fost adăugaţi unul din următorii esteri fosforici : glucozo-*6*-fosfat, fructozo-*6*-fosfat şi fructozo-*1*, *6*-difosfat. În aceste condiţii s-a observat că prezenţa în mediul de reacţie a unuia din aceşti esteri fosforici produce o creştere a acidului lactic, care este net superioară aceleia obţinută prin incubarea mediului în lipsa oricărui substrat sau în prezenţa glicogenului. Creşterea variază în funcţie

de esterul fosforic adăugat, valorile cele mai ridicate obţinîndu-se în prezenţa ca substrat a fructozo-*1*, *6*-difosfatului şi au fost aproximativ de 3 ori mai mari faţă de acelea obţinute cu ceilalţi esteri fosforici.

Trebuie să subliniem însă faptul că această creştere a glicolizei nu este proporţională cu timpul de stimulare. Astfel, după cum se vede din figura 3 şi tabela nr. 1, prin adăugarea mediului de reacţie a glucozo-*6*-fosfatului ca substrat, după o stimulare de 1 min, nivelul acidului lactic scade cu aproximativ 24% faţă de valorile obţinute la muşchii martori şi cu circa 70% prin stimulări de 3 min. Prelungind durata de stimulare la 5 min, se constată de această dată o creştere a valorilor acidului lactic cu 9%, faţă de acelea ale muşchilor martori nestimulaţi. Adăugînd mediului de reacţie fructozo-*6*-fosfat sau fructozo-*1,6*-difosfat, se constată mai întîi o creştere a acidului lactic de 42%, respectiv 55% (stimulare 1 min), apoi o scădere de 3% (stimulare 3 min), iar după o simulare de 5 min urmează o creştere de 46, respectiv 48%. Aşa dar, sensul modificărilor este acelaşi în ambele cazuri, fiind doar diferit ordinul de mărime.

Tabela nr. 1

Rata de formare a acidului lactic prin incubarea omogenatelor de muşchi stimulaţi 1, 3 şi 5 min în prezenţă de glucozo-*6*-fosfat, fructozo-*6*-fosfat şi şi fructozo-*1,6*-difosfat. Valorile reprezintă µg acid lactic/g ţesut umed/30 min incubare

Substratul adăugat mediului de reacţie	Muşchi martori	Durata timpului de stimulare (minute)		
		1	3	5
Glucozo-*6*-fosfat	81,4±3,7	61,2±4,5	24,3±5,1	89,8±4,8
Fructozo-*6*-fosfat	57,1±2,5	81,2±6,7	55,5±6,5	83,5±5,1
Fructozo-*1,6*-difosfat	164,8±9,8	238,5±10,4	159,3±8,7	242,3±12,6

Din datele prezentate, rezultă că prin stimularea de 1 min a muşchilor, în prezenţa de substrate fructozo-*6*-fosfat şi fructozo-*1,6*-difosfat, glicoliza creşte, scăzînd prin adăugarea glucozo-*6*-fosfatului. După o stimulare de 3 min se constată o inhibare a glicolizei în toate cazurile, dar în special prin adăugarea în mediul de reacţie a glucozo-*6*-fosfatului (70%), urmînd apoi o creştere a valorilor acidului lactic care depăşeşte în toate cele trei cazuri nivelul atins prin stimulare timp de 1 min (fig. 3).

F o s f o r i l a z a. Prin stimularea muşchilor gastrocnemieni de broască cu 5 impulsuri/sec la temperatura camerei şi într-un mediu aerob, se constată că activitatea fosforilazei *a* se modifică în funcţie de timpul de stimulare. Astfel, după 15 sec se constată o creştere bruscă a activităţii care ajunge pînă la 51% din activitatea totală. Stimulînd timp de 30 sec, procentul de fosforilază *a* începe să scadă pînă la 39,5%, în timp ce prin stimulare timp de 1 min el scade pînă la 18,7%, valoare foarte apropiată de nivelul valorilor procentuale de bază ale muşchilor în repaus, care este 17% (fig. 4).

Valorile de bază ale fosforilazei *a* obţinute de noi în muşchii în repaus (17%), deşi sînt mult scăzute faţă de valorile ridicate şi variabile obţinute cu alte tehnici, şi care se consideră ca nefiind reale [6], sînt totuşi crescute faţă de acelea obţinute de către Danforth [3], [6]. Aceste diferenţe pot fi explicate, printre altele, prin faptul că experienţele au fost executate în condiţii diferite de stimulare a muşchilor (aerobe în

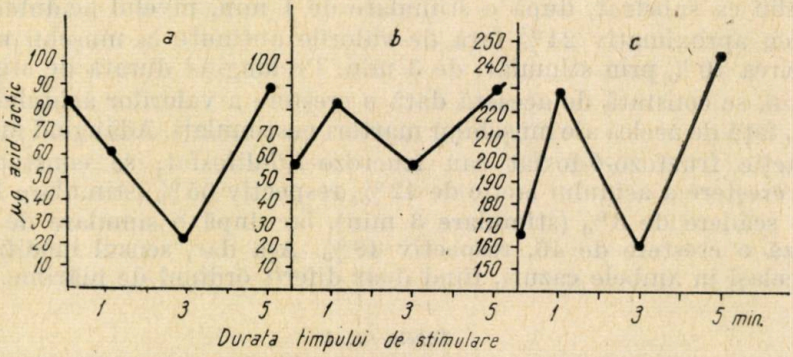


Fig. 3.— Formarea acidului lactic prin incubarea omogenatelor de muşchi stimulaţi 1,3 şi 5 min în prezenţă de glucozo-6-fosfat (*a*), fructozo-6- fosfat (*b*) şi fructozo-1,6-difosfat (*c*).
Valorile reprezintă µg acid lactic/g ţesut umed după 30 min incubare.

experienţele noastre) şi prin faptul că s-a lucrat pe alt muşchi (gastrocnemian).

Mărind mai mult durata de stimulare, la 3 şi 5 min, se constată o scădere netă a activităţii fosforilazei *a* pînă la 12, respectiv 9,6% din

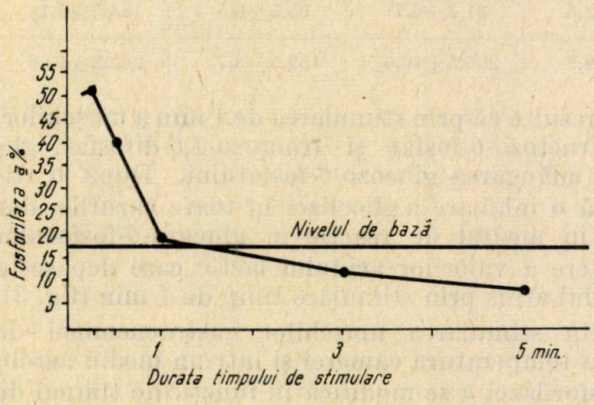


Fig. 4. — Formarea fosforilazei *a* prin stimularea muşchilor cu 5 imp/sec. Fiecare punct reprezintă media a cel puţin 6 determinări (condiţiile experimentale au fost descrise în capitolul „Material şi metode").

activitatea totală, procente care sînt sub nivelul de bază obţinute la muşchii în repaus. Acest fapt denotă o inhibiţie a formării fosforilazei *a* în muşchii obosiţi.

În experienţele noastre, deşi raportul fosforilază *a*/fosforilază *b* se modifică în cursul stimulării, totuşi activitatea totală (suma activităţii celor două fosforilaze) nu prezintă modificări semnificative.

Aldolaza. Pentru a avea o imagine mai clară a proceselor glicolitice care au loc în cursul stimulării, a fost determinată şi activitatea aldolazei în condiţii de stimulare identice cu acelea ale dozării activităţii fosforilazelor *a* şi *b* (fig. 5).

Din figura 5 se vede că, deşi după o stimulare de scurtă durată (15 sec) activitatea nu se modifică, după 30 sec, şi în special după 1 min

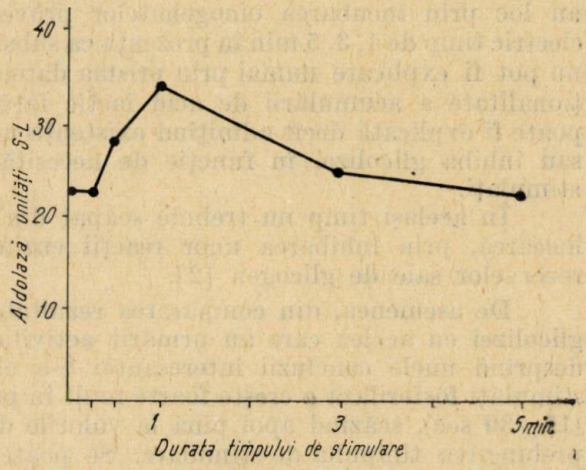


Fig. 5. — Activitatea aldolazei în muşchii stimulaţi cu 5 imp/sec. Fiecare punct reprezintă media a cel puţin 6 determinări (condiţiile experimentale au fost descrise în capitolul „Material şi metode").

de stimulare, activitatea aldolazei este evident crescută. După stimulări prelungite (3—5 min), nivelul activităţii aldolazei revine între limitele determinate la muşchii în repaus.

DISCUŢII

Rezultatele obţinute în condiţiile unei incubări aerobe a omogenatelor de muşchi stimulaţi arată că raţia de formare a lactatului este dependentă atît de substratul adăugat, cît şi de timpul de stimulare. Astfel, dacă adăugăm ca substrat glicogenul, acumularea de acid lactic are loc liniar, în funcţie de durata stimulării muşchilor, în timp ce prezenţa în mediul de reacţie a glucozo-*6*-fosfatului, fructozo-*6*-fosfatului şi fructozo-*1,6*-difosfatului, deşi face ca raţia de formare a acidului lactic să crească, ea nu este liniară.

Deci, prezenţa în mediul de reacţie a unuia din cele patru substrate utilizate determină o succesiune de reacţii a căror viteză este dependentă atît de substratul adăugat, cît şi de starea de activare sau de inhibare a enzimelor provocată prin stimulare.

Faptul că raţia cea mai mare de formare a lactatului se obţine în prezenţa fructozo-*1,6*-fosfatului poate fi explicat şi prin aceea că procesele care decurg pînă la formarea compuşilor finali nu mai sînt limitate de către fosfofructokinază [7], [8]. De asemenea, valorile mai scăzute obţi-

nute prin adăugarea glucozo-*6*-fosfatului ar putea fi explicate prin participarea acestuia în ciclul pentozo-fosfaților [11].

Rezultatele obținute prin adăugarea în mediul de reacție a unuia din cei trei esteri fosforici sînt diferite de acelea obținute utilizînd ca substrat glicogenul, cînd se constată o creștere liniară față de durata de stimulare.

Din datele prezentate reiese că succesiunea reacțiilor chimice care au loc prin incubarea omogenatelor provenite de la mușchi stimulați electric timp de 1, 3, 5 min în prezența ca substrat a celor trei esteri fosforici, nu pot fi explicate numai prin prisma datelor existente. Lipsa de proporționalitate a acumulării de acid lactic față de timpul de stimulare nu poate fi explicată decît admițînd existența unor sisteme care pot accelera sau inhiba glicoliza, în funcție de necesitățile energetice ale mușchilor stimulați.

În același timp nu trebuie scăpat din vedere faptul că organismul încearcă, prin inhibarea unor reacții enzimatice, să prevină epuizarea rezervelor sale de glicogen [2].

De asemenea, din compararea rezultatelor obținute prin cercetarea glicolizei cu acelea care au urmărit activitatea sistemului fosforilazic se desprind unele concluzii interesante. S-a observat astfel că în mușchii stimulați fosforilaza *a* crește foarte mult în primele secunde ale contracției (15—30 sec), scăzînd apoi pînă la valorile de bază și chiar sub ele, prin prelungirea timpului de stimulare. Se poate trage deci concluzia că nu fosforilaza *a* este aceea care are în exclusivitate rolul de reglare a glicolizei, prin controlul efectuat asupra degradării glicogenului. De altfel, această ipoteză este întărită și de faptul că lipsa fosforilazei *a* din mușchii unor specii de șoareci nu afectează rata de formare a lactatului, deși aceasta este mai mică comparativ cu aceea din speciile care o conțin [18].

Din datele experimentale obținute se poate afirma că fosforilaza *a* este responsabilă de accelerarea glicolizei în primele secunde ale contracției, în timp ce fosforilaza *b*, care este considerată pînă acum a fi inactivă, este cea care reglează glicoliza în mușchii supuși unor eforturi intense. Această ipoteză mai trebuie însă fundamentată și de alte experiențe suplimentare.

Totodată, în lucrarea de față se arată că prin stimulări de scurtă durată (30 sec și 1 min) se produce și o activare a aldolazei, ceea ce denotă că și această enzimă are un rol de reglare în procesele contractile musculare în primele ei faze.

În această privință este interesant de menționat că, după stimulări de 15 sec, activitatea aldolazei este între limitele de bază, în timp ce activitatea fosforilazei *a* este foarte mult crescută. În același timp, după 1 min de stimulare, avem un maxim de activitate a aldolazei, în timp ce în aceste condiții activitatea fosforilazei *a* este egală cu aceea a nivelului de bază.

Datele prezentate întăresc deci presupunerea că procesele glicolitice sînt condiționate de activitatea unor sisteme enzimatice cu rol de reglare, care sînt dependente de durata stimulărilor.

CONCLUZII

Determinarea glicolizei — în prezenţa unuia din următoarele substrate : glicogen, glucozo-*6*-fosfat, fructozo-*6*-fosfat şi fructozo-*1,6*-difosfat —a arătat că rata de formare a acidului lactic este dependentă atît de durata de stimulare a muşchilor, cît şi de substratul adăugat. Astfel, în prezenţa ca substrat a glicogenului, se constată o liniaritate în funcţie de timpul de stimulare, în timp ce prin adăugarea în mediul de reacţie a unuia din cei trei esteri fosforici nu se constată această dependenţă, deşi rata de formare a acidului lactic creşte.

Activitatea fosforilazei *a* este mult crescută după o stimulare de 15 sec, după 30 sec activitatea ei începe să scadă, ajungînd apoi, după 1 min de stimulare, la nivelul valorilor de bază. Prin mărirea duratei de stimulare, valorile sînt inferioare nivelului de bază, ceea ce denotă o inhibare a formării fosforilazei *a* în muşchii obosiţi.

Se constată o creştere a activităţii aldolazei după o stimulare de 30 sec şi 1 min, revenind la nivelul activităţii muşchilor martori prin prelungirea stimulării. Aceste date denotă faptul că şi această enzimă are un rol în reglarea proceselor glicolitice.

Se face presupunerea că procesele glicolitice sînt reglate de sisteme enzimatice a căror activitate variază în funcţie de durata stimulării muşchilor. Se emite ipoteza că fosforilaza *a* controlează procesele glicolitice în eforturi de scurtă durată, în timp ce fosforilaza *b* în acelea de durată prelungită.

(Mulţumesc pentru ajutorul tehnic competent acordat de T. Benţia)

Institutul de biochimie al Academiei
R. S. România Bucureşti

Prezentată la redacţie la 28 aprilie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. D. M. Needham, *Biochemistry of muscular action*, în *The structure and function of muscle*, sub redacţia lui G. H. Bourne, Acad. Press New York, **II**, 55, (1960).
2. C. F. Cori, *Regulation of enzyme activity in muscle during work*, în *Enzymes : units of biological structure and function*, sub redacţia lui O. H. Gaebler, Acad. Press, New York, 1956.
3. W. H. Danforth, E. Helmreich, *Regulation of glycolysis in muscle. I. The conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in frog sartorius muscle*, J. Biol. Chem., **239**, 3133, (1964).
4. S. Karpatkin, E. Helmreich, C. F. Cori, *Regulation of glycolysis in muscle. II. Effect of stimulation and epinephrine in isolated frog sartorius muscle*, J. Biol. Chem., **239**, 3139 (1964).
5. P. Özand, H. T. Narahara, *Regulation of glycolysis in muscle. III. Influence of insulin, epinephrine and contraction on phosphofructokinase activity in frog skeletal muscle*, J. Biol. Chem. **239**, 3146 (1964).
6. W. H. Danforth, E. Helmreich, C. F. Cori, *The effect of contraction and of epinephrine, on the phosphorylase activity of frog sartorius muscle*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. **48**, 1191 (1962).

7. J. V. Passoneau, O. H. Lowry, *Phosphofructokinase and the Pasteur effect*, Biochim. Biophys. Res. Comm., **7**, 10 (1962).
8. D. M. Regen, W. W. Davis, H. E. Morgan, C. R. Park, *The regulation of hexokinase and phosphofructokinase activity in heart muscle*, J. Biol. Chem., **239**, 43 (1964).
9. D. M. Regen, D. A. B. Young, W. W. Davis, J. Jack Jr., C. R. Park, *Ajustment of glycolysis to energy utilisation in the perfused rat heart*, J. Biol. Chem., **239**, 281 (1964).
10. D. Tănăsescu, *Les acides lactique et pyruvique des muscles gastrocnémiens de grenouille pendant la contraction izotonique*, Rev. roum. Biochim., **1**, 233 (1964).
11. A. Margreth, V. Muscatello, E. Andersson-Cedergren, *A morphological and biochemical study on the regulation carbohydrate metabolism in the muscle cell*, Exptl. Cell. Res., **32**, 484 (1963).
12. S. B. Barker, W. A. Summerson, *The colorimetric determination of lactic acid in biological material*, J. Biol. Chem., **138**, 535 (1941).
13. J. R. Williamson, *Metabolic effects of epinephrine in the isolated, perfused rat heart. I. Dissociation of the glycogenolytic from the metabolic stimulatory effect*, J. Biol. Chem., **239**, 2721 (1964).
14. M. Cornblath, P. J. Randle, A. Pereggiani, H. E. Morgan, *Regulation of glycogenolysis in muscle. Effects of glucagon and anoxia on lactate production, glycogen content and phosphorylase activity in the perfused isolated rat heart*, J. Biol. Chem., **238**, 1592 (1963).
15. C. H. Fiske, Y. Subbarow, *The colorimetric determination of phosphorus*, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
16. J. A. Sibley, A. L. Lehninger, *Determination of aldolase in animal tissues*, J. Biol. Chem., **177**, 859 (1949).
17. U. Srivastava, L. Berlinguet, *Aldolase activity in normal and dystrophic mouse muscle*, Can. J. Biochem., **42**, 1301 (1964).
18. W. H. Danforth, J. B. Lyon Jr., *Glycogenolysis during tetanic contraction of isolated mouse muscles in.the presence and absence of phosphorylase a*. J. Biol. Chem., **239**, 4047 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 335–336 (1965)

NOTE DE LABORATOR

DESPICAREA TOTALĂ A PLANTELOR PENTRU CERCETĂRI BIOCHIMICE COMPARATIVE *

LILICA BOTOŞĂNEANU

577.1 :578

Rezumat. — Se aduce o completare metodei despicării, descrisă într-o lucrare precedentă, cu scopul restrîngerii numărului de plante necesare executării analizelor biochimice. Tulpina şi rădăcina plantei sînt despicate longitudinal în două şi reunite, după ce între cele două părţi s-a introdus o fişie de material impermeabil. Cele două jumătăţi ale plantei, folosite una ca martor şi cealaltă pentru experimentare, prezintă valori asemănătoare pentru unii indici biochimici.

Într-o lucrare precedentă a fost descrisă „metoda despicării" pentru cercetări biochimice comparative la plante [1], elaborată pentru restrîngerea numărului de plante necesare executării analizelor biochimice, în cazul cînd indicii biochimici cercetaţi variază mult de la o plantă la alta. Metoda constă în despicarea în două a tulpinii pînă la rădăcină şi reunirea celor două jumătăţi după intercalarea unei fişii subţiri de material impermeabil.

Astfel, una dintre jumătăţile plantei poate servi pentru experimentare (de ex., introducerea diferitelor soluţii şi sucuri), pe cînd cealaltă serveşte ca martor. S-a constatat că plantele astfel despicate supravieţuiesc, părţile lor simetrice prezintă aceleaşi valori ale indicilor biochimici, iar substanţele introduse într-una din jumătăţile plantelor se răspîndesc şi acţionează numai în jumătatea respectivă.

Dat fiind că în unele cazuri n-ar fi exclusă trecerea prin rădăcină a substanţelor introduse dintr-o parte a plantei în cealaltă, la propunerea prof. E. Macovschi, am încercat folosirea în acelaşi scop a plantelor despicate total, procedînd în modul următor : planta scoasă din pămînt se secţionează longitudinal (tulpina şi rădăcina) ; între cele două jumătăţi se intercalează o fişie de material impermeabil (foiţă de cauciuc, gutiplast), apoi jumătăţile plantei se reunesc prin legături de leucoplast distanţate la 5–7 cm, se înfăşoară helicoidal cu rafie şi se plantează la loc. Este evident că despicarea totală a plantelor este mai puţin comodă decît despicarea tulpinii, necesită scoaterea plantei din pămînt şi efectuarea acestei operaţii în condiţii de evitare a uscării perilor absorbanţi. S-a constatat că plantele despicate total supravieţuiesc bine 2–3 săptămîni.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 3 (1965), în limba franceză.

Urma să verificăm, ca și în lucrarea precedentă, dacă indicii biochimici nu se modifică în urma operației de despicare totală și, în acest scop, am recurs la dozarea azotului total și la determinarea activității peroxidazice.

Am experimentat pe plante de tomate, soiul Zeelandia, în vîrstă de 3 luni. La 5 zile după despicare, am dozat azotul total în frunzele, tulpinile și rădăcinile celor două jumătăți ale plantelor despicate, precum și la plantele nedespicate, care au servit ca martor . În prealabil, părțile plantelor au fost uscate la 105°C pînă la greutate constantă, iar kjeldahlizarea s-a făcut după indicațiile date de A. N. Belozerski și N. T. Proscuriakov [2]. Activitatea peroxidazică s-a determinat după micrometoda D. M. Mihlin și Z. S. Bronovițkaia [3], de asemenea la 5 zile de la despicarea totală, însă numai pe frunze, atît la tomatele despicate, cît și la cele nedespicate.

Datele experimentale (tabela nr. 1) arată că la plantele despicate total părțile simetrice dau valori asemănătoare pentru indicii biochimici menționați și de același ordin de mărime cu indicii corespunzători ai plantelor martor.

Tabela nr. 1

Azotul total și activitatea peroxidazică la plante de tomate soiul Zeelandia (martor și despicate total)

Indice biochimic	Plante martor				Plante despicate total						
						Frunze		Tulpini		Rădăcini	
	Nr. plantei	Frunze	Tulpini	Rădăcini	Nr. plantei	parte stîngă	parte dreaptă	parte stîngă	parte dreaptă	parte stîngă	parte dreaptă
Azotul total (mg/g material uscat)	1	44	22	27	4	56	58	31	31	36	33
	2	60	27	27	5	44	42	25	25	33	32
	3	51	28	33	6	46	45	23	24	33	33
Activitatea peroxidazică ml iod 0,01 N/g material proaspăt)	7	5,29	—	—	10	5,69	5,45	—	—	—	—
	8	5,05	—	—	11	4,49	4,49	—	—	—	—
	9	6,34	—	—	12	6,25	6,25	—	—	—	—

Rezultatele obținute demonstrează că metoda despicării totale poate fi folosită pentru cercetări comparative în domeniul biochimiei vegetale, atunci cînd se lucrează pe un număr restrîns de plante și cînd condițiile experimentale o cer.

Prezentat la redacție la 29 aprilie 1965

Institutul de biochimie al Academiei R.S. România — București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, L. Botoșăneanu, *Metoda despicării pentru cercetări biochimice comparative la plante*, St. cerc. biochim., **6**, 485—490 (1963).
2. A. N. Belozerski, N. I. Proskuriacov, *Practicescoe rukovodstvo po biohimii rastenii*, Izdatelistvo „Sovetskaia nauca Moskva", 1951, str. 106.
3. A. I. Ermacov, V. V. Arasimovici, M. I. Smirnova, I. Konnikova, I. K. Murri, *Metodî biohimiceskovo issledovania rastenii*, Izdatelistvo seliskohoziaistvenoi literaturî Moskva—Leningrad, 1952, str. 65.

ST. CERC. BIOCHIM. 8, 3, 337–341 (1965)

PROCEDEU RAPID PENTRU PREPARAREA AGAROZEI

V. GHEŢIE, D. MOŢET şi C. DRAGOMIRESCU

545.845 :612.017

Rezumat. — Se descrie un procedeu simplu şi rapid de preparare a agarozei din agar, prin precipitarea agaropectinei cu clorură de cetil-piridiniu şi reţinerea pe un strat adsorbant-filtrant a complexului insolubil agaropectină-clorură de cetil-piridiniu şi a clorurii de cetil-piridiniu nereacţionate. Urmărind capacitatea de gelificare a preparatului, viteza curentului de electroendosmoză, adsorbţia cristal-violetului şi difuzia unui antigen bazic, autorii au ajuns la concluzia că agaroza preparată prin noul procedeu este similară cu cea obţinută după metodele curente.

Agaroza, principalul polizaharid neutru al agarului, se întrebuinţează din ce în ce mai frecvent în locul agarului în electroforeza analitică [1] [2] şi preparativă [3] [4], în imunodifuzie [5] şi în cromatografia şi electroforeza pe coloană [6–8]. De asemenea, agaroza tinde să înlocuiască agarul şi în unele tehnici bacteriologice şi imunologice [9].

Introducerea pe scară largă a agarozei în biochimia analitică a fost şi este limitată încă de metodele de preparare, laborioase, consumatoare de timp şi necesitînd uneori o aparatură specială. Abia de curînd agaroza a început să fie produsă şi de unele firme comerciale (MANN Research Lab., Seravac, Industrie biologique française).

Agaroza se poate obţine din agar prin trei metode : metoda Araki, modificată în unele detalii de S. Hjertén [1], metoda Hjertén [10] elaborată în 1962 şi metoda Russell, Mead şi Polson [11] apărută recent [1964).

Metoda Araki se bazează pe acetilarea agarului, extracţia agarozei acetilate în cloroform, precipitarea ei cu eter de petrol şi dezacetilarea cu hidroxid de potasiu. Folosirea acestei metode implică un număr mare de operaţii, consumă cantităţi însemnate de solvenţi organici şi durează 9 zile. Randamentul preparării este ceva mai mare de 60 %.

Metoda Hjertén se bazează pe precipitarea agaropectinei cu clorură de cetil-piridiniu, la temperatura de 65°C. Precipitatul se îndepărtează prin centrifugare de mare turaţie (13 000 *g*), la 65°C, iar excesul de clorură de cetil-piridiniu este îndepărtat prin adsorbţie pe pămînt Fuller (reactiv Lloyd). După îngheţarea-dezgheţarea şi spălarea repetată a gelului, agaroza se deshidratează prin liofilizare sau prin tratare cu alcool. Operaţiile durează 3 zile, iar randamentul este de aproximativ 45 %. Preparatul este mai puţin degradat şi are o capacitate de gelificare mai mare decît cel obţinut prin metoda Araki [10].

Metoda elaborată de Russell şi colab. se bazează pe izolarea agarozei prin precipitarea ei repetată cu polietilenglicol, la temperaturi ridicate. Operaţiile de preparare durează 3 zile, iar

randamentul oscilează între 30 și 45 %. Această metodă nu prezintă avantaje substanțiale față de metoda Hjertén, nici sub aspectul operațiunilor efectuate și nici prin calitățile materialului preparat.

Procedeul rapid de preparare pe care îl propunem în această notă se bazează, ca și metoda Hjertén, tot pe capacitatea clorurii de cetil-piridiniu de a precipita polizaharidele acide [12]. Separarea complexului insolubil agaropectină-clorură de cetil-piridiniu de agaroza neprecipitată nu se realizează însă prin centrifugare [10], ci prin filtrarea la cald a soluției diluate, peste un strat de material adsorbant. Materialul adsorbant are un dublu rol : permite filtrarea soluției vîscoase și reține excesul de clorură de cetil-piridiniu. Soluția caldă, filtrată, se introduce brusc, sub agitare, în etanol. Aceasta determină atît precipitarea agarozei, cît și solubilizarea urmelor de clorură de cetil-piridiniu care nu au fost reținute de materialul adsorbant-filtrant. După două scurte spălări succesive cu etanol și una cu eter etilic, precipitatul se usucă la aer. Se obține un praf perfect alb, cu excelente proprietăți de gelificare. Operațiile de preparare, inclusiv uscarea precipitatului, nu depășesc o jumătate de zi, iar randamentul este de aproximativ 40 %.

În cele ce urmează se dau detaliile noului procedeu și se descriu proprietățile preparatului astfel obținut.

PREPARAREA AGAROZEI

Precipitarea agaropectinei. Se încălzesc pe o sită, la fierbere, 200 ml dintr-o soluție 0,02 M de citrat de sodiu și se adaugă treptat, sub agitare continuă, 8 g de agar (Difco Noble Agar). Agitarea trebuie continuată pînă la dizolvarea completă a agarului ; în caz contrar, acesta se arde la fundul vasului și se degradează. Aparte se dizolvă 3 g clorură de cetil-piridiniu în 100 ml soluție de citrat de sodiu 0,02 M, adusă la fierbere. Soluția fierbinte de cetil-piridiniu se adaugă încet, sub agitare, în soluția de asemenea fierbinte de agar. Apare o tulbureală datorită formării unei suspensii coloidale a complexului insolubil agaropectină-clorură de cetil-piridiniu. Amestecul se ține 30 de minute în etuvă la 65°C, după care se diluează cu un volum egal de soluție de citrat de sodiu 0,02 M, se încălzește la 65°C, și se filtrează imediat. Diluarea micșorează vîscozitatea soluției, fără a solubiliza complexul agaropectină-clorură de cetil-piridiniu.

Precipitarea agaropectinei se poate realiza și cu bromură de cetil-piridiniu, substanță care se găsește în comerț sub forma unei soluții hidroalcoolice (bromocet).

Filtrarea prin material adsorbant-filtrant. O pîlnie Büchner de sticlă, cu un diametru de 20 cm, încălzită în prealabil în etuvă, se montează la un vas de trompă a cărui parte inferioară se scufundă într-un vas cu apa menținută în tot timpul filtrării la 65°C. Se așează în pîlnie o hîrtie de filtru cu filtrare lentă și se toarnă repede o suspensie apoasă de material adsorbant, încălzită tot la 65°C. Se conectează imediat vasul la trompa de apă și se lasă să se depună un strat de material adsorbant. De obicei, volumul suspensiei se alege astfel ca stratul adsorbant să nu depășească 4 mm. Dacă granulația materialului adsorbant este mare, în vasul de trompă filtrează un lichid fără urme de material adsorbant. Cînd stratul de material adsorbant de la suprafața filtrului începe să se întărească, se adaugă amestecul de filtrat, în trei porțiuni de cîte 200 ml fiecare. În condițiile noastre de lucru, stratul adsorbant din pîlnie se schimbă după fiecare 200 ml filtrați. În acest fel, filtrarea fiecărei porțiuni durează circa 1/2 oră. Pentru ca în acest timp amestecul să nu se gelifice, în pîlnie se introduce un vas Berzelius cu un diametru de 8—10 cm, umplut cu apă încălzită la 60—80°C. Pentru filtrarea unor cantități mai mari de lichid se poate confecționa un dispozitiv simplu de filtrare la cald [13].

Ca material adsorbant-filtrant am folosit talc, bentonită , oxid de aluminiu, permutit și kieselgur. Toate aceste materiale împiedică aproape în egală măsură încetinirea filtrării, însă au

o capacitate diferită de a absorbi clorura de cetil-piridiniu din soluţie. Din acest punct de vedere, ele pot fi aşezate în ordinea eficienţei astfel : permutit > oxid de aluminiu > talc, bentonită şi kieselgur. Urmele de clorură de cetil-piridiniu rămase sînt eliminate prin operaţiile ulterioare de precipitare şi spălare a agarozei cu etanol. Noi am folosit la filtrare, cu egal succes, oxidul de aluminiu, talcul şi kieselgurul, care au şi avantajul că nu reţin agaroza.

Pentru a obţine un filtrat de agaroză fără urme de material adsorbant, este necesar să se folosească o granulaţie cît mai mare a acestuia. De aceea, înainte de folosire, materialul adsorbant se spală şi se decantează cu apă, de numeroase ori, pentru a îndepărta particulele fine.

Sedimentarea stratului adsorbant este de asemenea o operaţie care necesită atenţie. Dacă stratul se usucă prea mult, viteza de filtrare este prea scăzută, iar dacă stratul rămîne prea îmbibat cu apă, suprafaţa sa filtrantă se strică la turnarea soluţiei de filtrat.

Precipitarea şi uscarea agarozei. Filtratul de agaroză se introduce repede într-un volum de 2—3 ori mai mare de etanol, agitat energic. Se formează un precipitat alb floconos de agaroză. După depunerea lui, se fac prin decantare încă două spălări cu etanol, de 30 de minute fiecare, cu agitare continuă. După decantarea ultimei porţiuni de etanol, se spală succesiv cu etanol absolut şi cu eter etilic. Se îndepărtează eterul după decantare şi precipitatul se usucă la aer. Se obţin 3—3,5 g agaroză.

Clorura de cetil-piridiniu, citratul de sodiu şi clorura de sodiu, ca şi alte săruri prezente în agar, sînt solubile în etanol, astfel că ele se îndepărtează din precipitat prin cele trei spălări succesive cu etanol (reacţia pentru clor este negativă în precipitatul de agaroză, iar absorbţia la 260 mμ, caracteristică pentru clorura de cetil-piridiniu [12] este neglijabilă).

PROPRIETĂŢILE GELULUI

Agaroza preparată prin procedeul indicat mai sus se prezintă ca un praf alb cu mare capacitate de gelificare. Produsul preparat de noi se gelifică la o concentraţie de 0,2 g%, în timp ce agaroza comercială (IBF) rămîne lichidă la această concentraţie. Gelul format este transparent.

Calitatea preparatului nostru am testat-o şi prin determinarea vitezei curentului de electroendosmoză şi a gradului de adsorbţie a unui colorant bazic (cristal-violet).

Curentul de electroendosmoză s-a determinat folosind ca substanţă indicatoare creatinina [14]. Gradul de adsorbţie a cristal-violetului a fost interpretat ca o măsură a numărului de gru-

Tabela nr. 1

Electroendosmoza şi adsorbţia în gelurile de agar şi agaroză *)

Produsul	Viteza curentului de electroendosmoză ($\times 10^{-5}$ cm^2/V/s)	Zona de adsorbţie a cristal-violetului (mm)
Agar (Noble Difco)	0,95	19,5
Agaroză preparată după metoda Araki [1]	0,19	5,0
Agaroză comercială (IBF)	0,28	8,0
Agaroză preparată după procedeul recomandat	0,31	5,5

*) Tampon fosfat de sodiu pH = 6,8, 0,02 M [1]. Potenţial 20 V/cm, durata migrării 2 ore. Concentraţia gelurilor 1%. Rezultatele reprezintă media a 3 determinări.

părți ionogene, carboxil și sulfat, prezente în gel. Am folosit și acest ultim procedeu, preconizat de S. Hjertèn [1], deoarece existența electroendosmozei nu este echivalentă cu existența unor grupări încărcate electric, chiar suprafețe neionogene putînd prezenta un potențial electrocinetic [15] [16].

Rezultatele prezentate în tabela nr. 1 arată că produsul preparat după procedeul nostru este similar, din punctul de vedere al vitezei de electroendosmoză, cu agaroza comercială și, sub raportul adsorbției cristal-violetului, cu agaroza obținută prin metoda Araki. Față de agarul din care a fost preparată, agaroza prezintă o viteză de electroendosmoză de 3 ori mai mică și adsoarbe cristal-violetul de 3,5 ori mai slab. Această ultimă constatare este în concordanță cu datele obținute prin imunoprecipitarea în gel a unui antigen bazic vegetal, cu antiserul omolog.

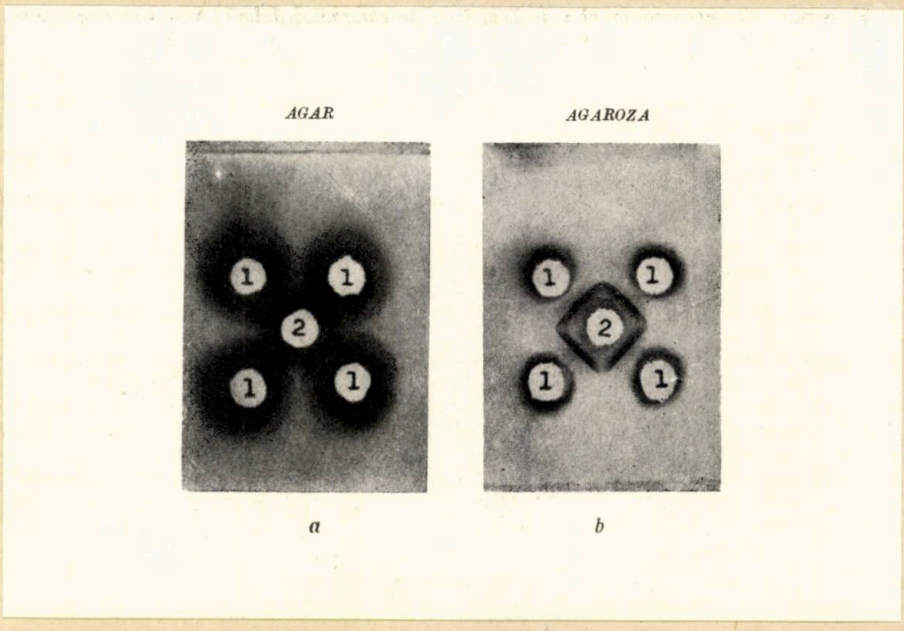


Fig. 1. — Dubla difuzie în gel a proteinelor din citoplasma semințelor de bob (*Vicia faba*). 1 : antigen ; 2 : antiser de iepure, omolog. Difuzia în gel a durat 48 de ore, după care plăcile s-au spălat timp de 48 de ore cu soluție salină fiziologică ; colorație cu azocarmin.

Dispariția haloului arată că proteina bazică este legată slab de către gel și poate fi îndepărtată chiar prin spălare cu soluție salină fiziologică. Așa cum se observă din figura 1, în gelul de agaroză citirea reacției imune este astfel ușurată considerabil.

Institutul de biochimie al Academiei
R.S. România, București

Prezentat la redacție la 17 aprilie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. S. Hjertèn, *Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 514 (1961).
2. V. Gheţie, D. Moţet-Grigoraş, *Electroforeza şi imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, St. cerc. biochim., **5**, 409 (1962).
3. D. Moţet, V. Gheţie, *Preparative electrophoresis in agarose gel*, Rev. roum. Biochim., **1**, 175 (1964).
4. J. Uriel, S. Avrameas, *Method of preparative electrophoresis in horizontal gels*, Nature, **202** (**4936**), 1005 (1964).
5. S. Brishammar, S. Hjertèn, B. v. Hofsten, *Immunological precipitates in agarose gels*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 518 (1961).
6. S. Hjertèn, *Chromatographic separation according to size of macromolecules and cell particules on columns of agarose suspensions*, Arch. Biochem. Biophys., **99**, 466 (1962).
7. S. Hjertèn, *The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles*, Biochim. Biophys Acta, **79**, 393 (1964).
8. S. Hjertèn, *Zone electrophoresis in columns of agarose suspensions*, J. Chromat., **12**, 510 (1963).
9. J. Sterzl, L. Mandel, *Estimation of the inductive phase of antibody formation by plaque technique*, Folia Microbiol., **9**, 173 (1964).
10. S. Hjertèn, *A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis*, Biochim. Biophys. Acta, **62**, 445 (1962).
11. B. Russell, T. H. Mead, A. Polson, *A method of preparating agarose*, Biochim. Biophys. Acta, **86**, 169. (1964).
12. J. E. Scott, *Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues*, în D. Glick : *Methods in biochemical analysis*, Intrescience Publ., New York, 1960, v. VIII, p. 146.
13. B. Keil, *Tehnica lucrărilor de laborator în chimia organică*, Ed. tehnică, Bucureşti, 1959, p. 173.
14. R. Consden, W. M. Stanier, *Ionophoresis of sugars on paper and some applications to the analysis of protein polysaccharide complexes*, Nature, **169**, 783 (1952).
15. D. A. Haydon, *The surface charge of cells and some other small particles as indicated by electrophoresis. I. The zeta potential-surface charge relationships*, Biochim. Biophys. Acta, **50**, 450 (1961).
16. D. A. Haydon, *The surface charge of cells and some other small particles as indicated by electrophoresis. II. The interpretation of the electrophoretic charge*, Biochim. Biophys. Acta, **50**, 457 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 343–344 (1965)

PROCEDEU DE OBȚINERE A BENZILOR CROMATOGRAFICE FOLOSITE ÎN METODA MATHIAS

ALICE KAPRI

543.018

Rezumat. — Pentru obținerea benzilor de hîrtie folosite în metoda Mathias se preconizează decuparea, cu compasul, a unor cercuri, la 5—6 cm distanță de baza hîrtiei.

Dintre metodele de separare cromatografică, care se bazează pe developare radială precedată de o prefracționare (Marchal și Mittwer [2], Schwerdtfeger (cit. după [1]) etc.), cea mai frecvent utilizată — deoarece permite și analiza în serie — este tehnica Mathias (cit. după [1]).

Modificarea adusă de către Mathias constă în realizarea prefracționării compușilor pe o bandă de hîrtie îngustă, urmată de developare ascendentă pe aceeași bandă. Benzile de hîrtie se obțin fie prin decuparea lor după un tipar, fie cu ajutorul unor ștanțe special construite.

Obținerea benzilor de hîrtie cu pețiol după metoda Mathias fiind laborioasă, s-a încercat un alt procedeu.

Pe hîrtie, la 5—6 cm distanță de la bază, se decupează cu un compas cu gheare o serie de cercuri, cu centrele situate pe aceeași linie, așa fel ca între ele să se repete de fiecare dată un interval de 2—3 cm. Cercurile se detașează ușor, lăsînd între ele pețiolul pe care se aduce soluția de analizat.

În altă variantă, în locul cercurilor se pot decupa semicercuri, rezultatele în ceea ce privește operația de separare fiind aceleași, numai că baza hîrtiei este mai rezistentă (fig. 1).

În afara simplității, procedeul propus de noi prezintă avantajul că, variind diametrele cercurilor, se pot obține diferite lățimi de bandă.

Developînd soluții de aminoacizi martori pe benzi de hîrtie obținute prin procedeul Mathias și acel propus de noi, se obțin separări identice (fig. 2).

Secția de biomorfologie,
Academia R.S.România, Filiala Iași

Prezentată la redacție la 4 martie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Hais I. M., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, București, 1960.
2. Marchal J. G., Mittwer P., *Comptes rendues*, **145**, 417 (1951).

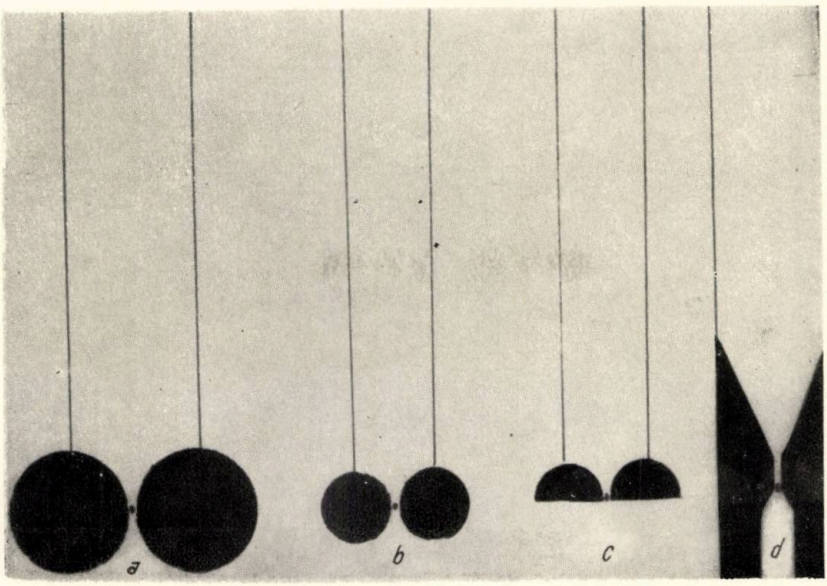


Fig. 1. — Benzi de hîrtie cromatografică obținute prin procedeul Mathias (*d*) și cel propus de noi (*a*, *b*, *c*).

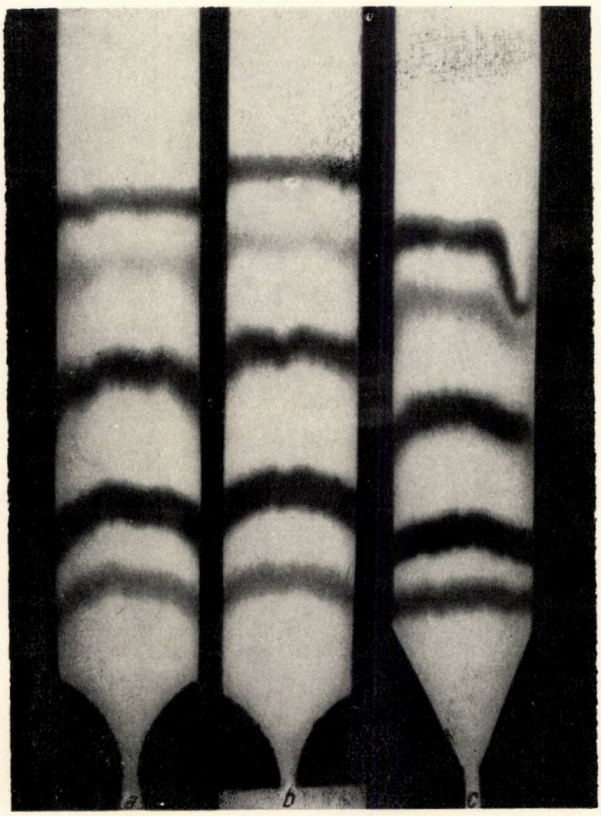


Fig. 2. — Cromatograma aminoacizilor pe benzi de hîrtie obținute prin procedeul Mathias (*c*) și cel propus de noi (*a*, *b*).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 3, 345–361 (1965)

REFERAT GENERAL

CÎTEVA OBSERVAŢII CU PRIVIRE LA FOLOSIREA CALCULELOR STATISTICE ÎN CERCETĂRILE DE BIOCHIMIE

HORIA SLUŞANSCHI

578.087.1 : 577.1

Cine îşi dă osteneala să consulte anii mai vechi ai colecţiilor de periodice din domeniul ştiinţelor biologice nu poate să nu observe o trăsătură caracteristică prin care lucrările ştiinţifice din trecut se deosebesc de cele din prezent, dincolo de tematica abordată şi de mijloacele tehnice de investigaţie folosite : este modul de prelucrare şi interpretare a rezultatelor experimentale. Se poate afirma că unul din progresele incontestabile realizate faţă de trecut — şi nu este vorba de un trecut foarte îndepărtat — constă în atitudinea mai critică a cercetătorului faţă de rezultatele observaţiilor şi măsurătorilor sale şi, îndeosebi, în prudenţa cu care el le interpretează, recurgînd în acest scop la criteriile obiective pe care i le poate pune la îndemînă calculul statistic. De altfel, faptul că în această privinţă situaţia de astăzi este alta decît cea de mai înainte apare limpede şi din dezvoltarea amplă pe care a luat-o literatura ştiinţifică specială, consacrată problemelor de tehnică a punerii experienţelor şi de prelucrare a rezultatelor acestora prin calcul statistic.

Dar, deşi preocuparea de a uza de acest instrument modern de lucru, devenit indispensabil, se manifestă astăzi în toate acele domenii ale biologiei care comportă măsurători exprimate cifric, nu mai puţin adevărat este că, din păcate, nu rareori modul cum acest instrument este mînuit mai lasă de dorit şi că, din această cauză, cercetătorul care apelează la serviciile lui nu obţine tot ceea ce el ar fi în stare să dea. Cauzele neajunsurilor de acest fel sînt îndeosebi următoarele două :

— cercetătorul începe să se preocupe de prelucrarea rezultatelor sale experimentale prin calcul statistic abia după ce şi-a încheiat experienţele, nu încă din momentul cînd îşi elaborează planul de cercetare;

— cercetătorul aplică o aceeaşi schemă de calcul statistic, de obicei una din cele mai simple, indiferent de modul în care şi-a pus şi urmărit experienţele.

Este însă un adevăr elementar că, pentru a obţine un răspuns limpede în diversele aspecte ale unei probleme, schema experimentală trebuie aleasă ţinînd seama nu numai de numărul acestor aspecte, ci şi de posibilităţile foarte diferite ale diverselor metode de calcul statistic de a da răspunsurile căutate : o anumită schemă experimentală presupune o anumită metodă de calcul statistic, şi invers.

Neglijarea principiului de mai sus se manifestă adeseori și prin faptul că, deși execută sute sau mii de analize, cercetătorul nu dobîndește răspunsuri atît de clare ca acelea pe care i le-ar putea da un număr de determinări considerabil mai redus, executate însă după o schemă experimentală mai judicios aleasă și prelucrate prin metoda de calcul cea mai adecvată acestei scheme.

În cele ce urmează ne propunem să dăm cîteva exemple de folosire neadecvată a calculelor statistice în cercetările de biochimie și să arătăm soluțiile corecte corespunzătoare, din dorința de a contribui astfel la înlăturarea cît mai grabnică a neajunsurilor care mai stăruie în această privință în unele lucrări publicate sau prezentate spre publicare. Exemplele vor fi, bineînțeles, fictive în ce privește tematica și cifrele, dar reale în ce privește natura greșelilor de prelucrare statistică mai frecvent întîlnite. Aceasta ne va permite să tratăm problemele fără a viza pe nimeni. Vom presupune totodată că noțiunile elementare cu care se operează în calculul statistic, ca abaterea standard, varianța, suma pătratelor abaterilor, probabilitatea de transgresiune și altele, ca și schemele experimentale cele mai simple sînt cunoscute, și vom folosi notațiile cele mai larg răspîndite în literatura mondială, respectiv în cea românească, anume :

x, x_1, x_2 = un rezultat cifric individual
$\bar{x}$ = media aritmetică generală a celor N rezultate înregistrate într-o experiență
$\bar{x}_1$, $\bar{x}_2$ = media aritmetică a celor n_1 respectiv n_2 rezultate înregistrate în cîte una din variantele experienței
s^2 = varianța unui rezultat individual x față de media experimentală $\bar{x}$
$s^2_{\bar{x}}$ = varianța unei medii experimentale $\bar{x}$ față de valoarea medie reală a mărimii respective
s^2_d = varianța diferenței dintre două medii experimentale $\bar{x}_1$ și $\bar{x}_2$
s, $s_{\bar{x}}$, s_d = abaterile standard corespunzătoare varianțelor s^2, $s^2_{\bar{x}}$ și s^2_d
P = probabilitatea de transgresiune
SP = suma pătratelor abaterilor
$SP_{(A)}$ = suma pătratelor abaterilor datorite acțiunii factorului A
$SP_{(AB)}$ = suma pătratelor abaterilor datorite acțiunii combinate a factorilor A și B
$SP_{(A\times B)}$ = suma pătratelor abaterilor datorite interacțiunii factorilor A și B
GL = grade de libertate
$DL_{5\%}$ = diferența limită semnificativă dintre două medii experimentale, la probabilitatea de transgresiune $P = 5\%(= 0{,}05)$.

Exemplul 1. Presupunem că un grup de animale sau plante, astfel constituit încît să reprezinte o populație cît mai omogenă, a fost împărțit în 2 loturi de cîte 6 indivizi, și că unul din loturi a fost supus unui tratament ale cărui efecte s-au examinat prin determinarea unui anumit component, după sacrificarea organismelor respective.

Într-un asemenea caz, datele experimentale și rezultatele calculelor statistice sînt prezentate uneori cam în felul arătat în tabela nr. 1, adică indicîndu-se valorile individuale înregistrate, mediile respective și abaterea standard a valorilor individuale din fiecare variantă, față de media corespunzătoare.

Se face astfel o dublă greșeală :

Mai întîi, abaterile standard calculate pentru fiecare lot în parte, pe baza cîte unui număr de observații atît de redus, sînt prea puțin sigure ca să servească drept criteriu de comparație. În asemenea cazuri, avînd în vedere că inițial s-a plecat de la o populație socotită omogenă și presupunînd că cele două loturi nu diferă între ele decît prin media valorilor com-

ponentului determinat, se recomandă să se calculeze o abatere standard comună, respectiv o varianță comună, folosind totalitatea rezultatelor experimentale obținute.

În al doilea rînd, comparația prezentată în felul indicat în tabela nr. 1 nici nu este dusă pînă la capăt din punct de vedere statistic, iar acest fapt explică de ce, într-un caz ca cel de mai sus, al cărui tip este real, cercetătorul respectiv a putut formula cu seninătate concluzia că efectul tratamentului aplicat se manifestă printr-o scădere a concentrației componentului urmărit.

Tabela nr. 1

Exemplu de comparație greșită între două medii experimentale

	Lotul martor	Lotul tratat
	11,2	12,8
	11,6	8,7
	12,9	10,0
	9,6	9,8
	12,2	10,5
	11,5	9,0
$\bar{x}$	11,50	10,13
s	1,15	1,46

Că nu aceasta este concluzia cea mai justă ce se desprinde din datele experimentale ale tabelei nr. 1 o arată rezultatele calculelor statistice efectuate după metoda adecvată cazului de față, anume aceea a comparației între două medii calculate din valori individuale independente, observate pe loturi mici.

Într-un asemenea caz este necesar să se calculeze mai întîi varianța comună s^2 pentru ansamblul celor două serii de date experimentale (x_1 din lotul martor și x_2 din lotul tratat), fiecare cuprinzînd cîte $n = 6$ valori, după relația :

$$s^2 = \frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{2n - 2} = \tag{1a}$$

$$= \frac{\left(\sum x_1^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n}\right) + \left(\sum x_2^2 - \frac{(\sum x_2)^2}{n}\right)}{2n - 2}. \tag{1b}$$

Forma (1b) a relației de mai sus fiind mai practică pentru efectuarea calculelor, o vom folosi pe aceasta. Din valorile numerice ale datelor experimentale x_1 și x_2 se poate găsi ușor că :

$\sum x_1 = 11,2 + 11,6 + \ldots 11,5 = 69,0$
$(\sum x_1)^2 = 69,0^2 = 4761,00$
$\sum x_1^2 = 11,2^2 + 11,6^2 + \ldots 11,5^2 = 799,66$
$\sum x_2 = 12,8 + 8,7 + \ldots 9,0 = 60,8$
$(\sum x_2)^2 = 60,8^2 = 3696,64$
$\sum x_2^2 = 12,8^2 + 8,7^2 + \ldots 9,0^2 = 626,82$

Ținînd seama că $n = 6$ și introducînd în relația (1b) toate valorile numerice respective, găsim $s^2 = 1,687$.

Folosind această varianță comună, urmează acum să examinăm dacă diferența dintre valorile medii $\bar{x}_1$ și $\bar{x}_2$ obținute pentru cele două variante ale experienței este sau nu semnificativă, în care scop vom recurge la testul t.

După cum se știe, acest test se poate efectua pe două căi. Una din ele consistă în calcularea valorii empirice (experimentale) a raportului t (numit și „abatere redusă") dintre diferența mediilor ce se compară ($\bar{x}_1 - \bar{x}_2$) și abaterea standard s_d a acestei diferențe :

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d}. \tag{2}$$

În tabela de distribuție a lui t se caută apoi probabilitatea de transgresiune P ce corespunde pe de o parte valorii t astfel găsite, pe de alta numărului de grade de libertate ce au stat la baza calculului varianței s^2.

Pentru a găsi abaterea standard s_d vom calcula mai întîi varianța s_d^2 corespunzătoare, plecînd de la faptul cunoscut că dacă varianța unui rezultat individual x este s^2, atunci varianța $s_{\bar{x}}^2$ a unei medii $\bar{x}$ din n valori individuale x este dată de raportul:

$$s_{\bar{x}}^2 = \frac{s^2}{n} \tag{3}$$

precum și de la faptul că varianța s_d^2 a diferenței $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ dintre două medii este egală cu suma varianțelor acestor medii:

$$s_d^2 = s_{\bar{x}_1}^2 + s_{\bar{x}_2}^2. \tag{4}$$

Cum în cazul de față termenii celui de-al 2-lea membru al relației (4) sînt egali între ei, deoarece mai sus am calculat o singură varianță comună s^2 pentru toate valorile individuale x observate în experiență (n fiind mic), vom avea, combinînd relațiile (3) și (4):

$$s_d^2 = 2\, s_{\bar{x}}^2 = \frac{2\, s^2}{n} \tag{5}$$

de unde:

$$s_d = \sqrt{\frac{2\, s^2}{n}}. \tag{6}$$

Introducînd în relația (6) valorile numerice corespunzătoare ale lui s^2 și n, găsim: $s_d = 0{,}75$.

Pe de altă parte, cum după tabela nr. 1 diferența experimentală $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ este egală cu $11{,}50 - 10{,}13 = 1{,}37$, valoarea lui t calculată după relația (2) va fi 1,826.

Căutînd în tabela de distribuție a lui t valoarea probabilității P corespunzătoare celor $2n - 2 = 12 - 2 = 10$ grade de libertate ce au servit la calcularea varianței s^2, găsim că $P \sim 0{,}10$. Așadar, diferența dintre cele două valori medii găsite la loturile examinate nu este semnificativă și, ca atare, nu se poate afirma că în experiența de mai sus tratamentul aplicat ar fi avut un efect asigurat din punct de vedere statistic (dacă limita de siguranță aleasă este cea uzuală, adică $P = 0{,}05$).*)

La aceeași concluzie ajungem și pe cea de-a doua cale de efectuare a testului t, care consistă în stabilirea celei mai mici valori pe care diferența dintre cele două medii ar trebui

*) Aceeași schemă generală de calcul se aplică și atunci cînd cele două valori medii experimentale $\bar{x}_1$ și $\bar{x}_2$ care urmează să fie comparate rezultă dintr-un număr diferit de valori individuale, n_1 și n_2. În astfel de cazuri vom avea însă:

$$s^2 = \frac{(x_1 - \bar{x}_1)^2 + (x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} = \tag{1'a}$$

$$= \frac{\left(\Sigma x_1^2 - \frac{(\Sigma x_1)^2}{n_1}\right) + \left(\Sigma x_2^2 - \frac{(\Sigma x_2)^2}{n_2}\right)}{n_1 + n_2 - 2} \tag{1'b}$$

$$s_{\bar{x}_1}^2 = \frac{s^2}{n_1} \quad \text{și} \quad s_{\bar{x}_2}^2 = \frac{s^2}{n_2} \tag{3'}$$

$$s_d^2 = \frac{s^2}{n_1} + v\,\frac{s^2}{n_2} = s^2 \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \tag{5'}$$

$$s_d = \sqrt{s^2 \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}} \tag{6'}$$

s-o aibă pentru ca efectul tratamentului să poată fi considerat semnificativ. Această diferenţă limită semnificativă *DL* este dată de relaţia :

$$DL = s_d \cdot t \tag{7}$$

unde pentru t se ia de astă dată valoarea teoretică indicată în tabela de distribuţie respectivă în dreptul numărului gradelor de libertate pe care se bazează varianţa s^2, la probabilitatea de transgresiune aleasă ca măsură a gradului de semnificaţie (pentru evitarea confuziilor, această valoare teoretică, numită „abatere normală", se notează uneori t_0). Pentru $GL = 10$ şi $P = 0{,}05$, găsim $t_0 = 2{,}23$, aşa că $DL_{0,05} = 0{,}75 \cdot 2{,}23 = 1{,}67$.

Diferenţa experimentală $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ fiind egală însă numai cu 1,37, înseamnă că nu este semnificativă, ci întîmplătoare.

Pentru ca această concluzie finală la care ne duce testul t să poată fi desprinsă imediat de cititorul căruia i se prezintă datele tabelei nr. 1, autorul respectiv ar fi trebuit deci să completeze acest tabel fie cu indicaţia $P > 0{,}05$, fie cu indicaţia $DL_{0,05} = 1{,}67$, suprimînd totodată cele două valori incerte ale abaterilor standard s. De fapt, într-o experienţă de genul celei discutate aici ar fi suficient să se prezinte ca material cifric demonstrativ numai cele două valori medii înregistrate şi rezultatul testului t, fie sub forma valorii lui P, fie sub forma valorii lui *DL*, preferabilă fiind aceasta din urmă, care este mai demonstrativă. Nu are însă nici o utilitate prezentarea concomitentă a valorii experimentale a lui t, calculată după relaţia (2), ea fiind cuprinsă de fapt în valoarea lui P, şi, bineînţeles, nici prezentarea valorii lui t_0 care este cuprinsă în *DL*. De asemenea nu este necesară nici prezentarea abaterii standard comune s, calculată din varianţa comună s^2 găsită după relaţia (1b), deoarece şi aceasta este cuprinsă de fapt în valorile indicate pentru P sau *DL*.

Dar, deşi în experienţa de mai sus nu s-a înregistrat o diferenţă semnificativă între valorile medii corespunzătoare celor două loturi comparate, s-ar putea totuşi ca în realitate tratamentul aplicat să aibă un anumit efect, care însă a fost acoperit de unele erori de tehnică experimentală (loturi prea puţin omogene, metode de determinare insuficient de precise etc.), datorită cărora varianţa s^2 a valorilor individuale este prea mare, ceea ce face ca şi diferenţa limită semnificativă *DL* dintre medii să atingă valori prea ridicate.

Exemplul 2. Uneori, cînd natura cercetărilor permite, de exemplu cînd analizele ce urmează a fi efectuate nu implică sacrificarea materialului viu folosit, influenţa neuniformităţii inevitabile a loturilor experimentale poate fi mult atenuată prin folosirea unei scheme de lucru în care un acelaşi lot de organisme este folosit mai întîi ca martor, apoi supus tratamentului respectiv şi studiat din nou.

Din păcate însă, avantajele pe care le oferă această metodă nu sînt totdeauna corect exploatate. Într-adevăr, nu rare sînt cazurile cînd comparaţia dintre cele două serii de rezultate experimentale obţinute cu ajutorul ei se face aplicîndu-se aceeaşi schemă de calcul statistic ca în exemplul 1 de mai sus, deşi situaţia în care ne găsim aici este cu totul alta : în timp ce în exemplul 1 rezultatele înregistrate în cele două variante ale experienţei erau complet independente unul de altul, deoarece proveneau de la organisme cu totul diferite, în cazul de faţă rezultatele sînt legate între ele două cîte două, formînd perechi, deoarece fiecărei valori înregistrate pe un anumit organism în varianta martor a experienţei îi corespnde o anumită valoare înregistrată pe acelaşi organism în varianta tratată.

Să presupunem, de exemplu, că la un lot de 6 animale sau plante din aceeaşi specie s-a determinat conţinutul procentual al unui component al serului sau sevei, înainte şi imediat după aplicarea unui anumit tratament, înregistrîndu-se rezultatele din tabela nr. 2.

O comparație cu tabela nr. 1 arată că în cazul de față plecăm în realitate de la aceleași valori numerice ca și în exemplul 1, dispuse numai într-o altă ordine. Esențial însă pentru acest al doilea exemplu este faptul că valorile din primele două coloane sînt presupuse a fi legate între ele două cîte două, formînd perechi. Dacă acest din urmă fapt se neglijează, așa cum se întîmplă uneori, și dacă rezultatele experimentale din tabela nr. 2 se prelucrează

Tabela nr. 2

Rezultatele unei experiențe efectuate după metoda perechilor

Înainte de tratament (martor, x_1)	După tratament (x_2)	Diferența $x_1 - x_2 = x$
12,9	12,8	0,1
11,2	9,0	2,2
9,6	8,7	0,9
11,5	9,8	1,7
11,6	10,0	1,6
12,2	10,5	1,7
Σx_1 69,0	Σx_2 60,8	Σx 8,2
$\bar{x}_1$ 11,50	$\bar{x}_2$ 10,13	$\bar{x}$ 1,37

așa ca în exemplul 1, prin metoda obișnuită a comparației între două medii experimentale calculate din valori individuale independente, concluzia nu va putea fi alta decît cea de mai înainte, deoarece valorile mediii comparate sînt și ele aceleași, iar mărimea indicilor statistici pe baza cărora se face interpretarea (*s*, *t*, *DL*) rămîne influențată de aceiași factori de eroare care au putut interveni și în schema experimentală corespunzătoare exemplului 1.

Caracteristic pentru metoda perechilor este însă faptul că în prelucrarea statistică a rezultatelor obținute cu ajutorul ei se folosesc nu valorile individuale brute înregistrate, ci *diferențele* dintre valorile-perechi, ceea ce permite să se micșoreze — și chiar să se elimine — influența neuniformității loturilor experimentale. Acesta este și motivul pentru care omogenitatea materialului viu folosit nici nu mai prezintă vreo importanță în cazul acestei metode de experimentare și nu mai acoperă eventuala influență a tratamentelor studiate. Aceasta înseamnă însă că dacă prelucrăm datele tabelei nr. 2 nu ca în exemplul 1, ci după schema de calcul statistic adecvată metodei perechilor, cu ajutorul căreia ele au și fost obținute, am putea ajunge la cu totul alte concluzii.

Vom calcula deci mai întîi varianța diferențelor dintre cele $n = 6$ perechi de valori $x_1 - x_2 = x$, plecînd de la relația generală bine cunoscută:

$$s^2 = \frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1} = \tag{8a}$$

$$= \frac{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}{n - 1} \tag{8b}$$

Folosind forma (8b) a relației și ținînd seama că în cazul de față

$$(\Sigma x)^2 = 8{,}2^2 = 67{,}24$$

$$\Sigma x^2 = 0{,}1^2 + 2{,}2^2 + \ldots . 1{,}7^2 = 14{,}00$$

găsim că $s^2 = 0{,}5587$.

Calculăm apoi valoarea experimentală a lui t, făcînd în cazul de față raportul între media $\bar{x}$ a diferențelor înregistrate și abaterea standard $s_{\bar{x}}$ a acestei medii $\bar{x}$:

$$t = \frac{\bar{x}}{s_{\bar{x}}}. \tag{9}$$

Pentru a afla pe $s_{\bar{x}}$ vom ține seama aici de faptul că varianța diferențelor individuale x fiind s^2, varianța $s^2_{\bar{x}}$ a mediei lor $\bar{x}$ obținute din n valori individuale va fi egală, întocmai ca în cazul relației (3) de mai sus, cu raportul s^2/n; rădăcina pătrată a acestui raport ne dă deci valoarea căutată a lui $s_{\bar{x}}$. Găsim astfel pînă la urmă că $t = 4{,}49$.

Căutînd în tabela de distribuție a lui t valoarea probabilității P corespunzătoare celor $n - 1 = 5$ grade de libertate ce au servit la calcularea varianței s^2 după relația (8b), găsim că $P < 0{,}01$.

Așadar, studiind influența tratamentului prin metoda perechilor și prelucrînd rezultatele experimentale după regulile statistice corespunzătoare acestei metode, ajungem la concluzia că tratamentul aplicat a avut un efect distinct semnificativ de micșorare a concentrației în ser sau sevă a componentului pe care l-am urmărit.

La aceeași concluzie ajungem și calculînd valoarea limită semnificativă DL a diferenței medii dintre cele 6 perechi de rezultate experimentale. În cazul de față, varianța diferențelor individuale x fiind $s^2 = 0{,}5587$, varianța $s^2_{\bar{x}}$ a diferenței medii, calculată după relația (3), va fi $0{,}5587/6 = 0{,}0931$, iar abaterea standard corespunzătoare $s_{\bar{x}}$ va fi $\sqrt{0{,}0931} = 0{,}3051$. Căutînd în tabela de distribuție a lui t valorile teoretice (t_0) corespunzătoare celor $n - 1 = 6 - 1 = 5$ grade de libertate ce au servit la calcularea varianței s^2 după relația (8b), găsim că la $P = 0{,}05$ corespunde $t = 2{,}57$, iar la $P = 0{,}01$ corespunde $t = 4{,}03$. În consecință, ținînd seamă de relația (7) și știind că aici $s_d = s_{\bar{x}}$, vom avea:

$$DL_{0{,}05} = 0{,}3051 \cdot 2{,}57 = 0{,}78$$

$$DL_{0{,}01} = 0{,}3051 \cdot 4{,}03 = 1{,}23$$

Așadar, tratamentul aplicat s-ar fi dovedit a avea un efect semnificativ chiar dacă diferența $\bar{x}$ dintre valorile medii înregistrate în cele două variante ale experienței ar fi fost egală cu numai 0,78. Cum însă în cazul de față diferența medie experimentală 1,37 depășește chiar valoarea 1,23 a lui $DL_{0{,}01}$, tragem concluzia că efectul a fost distinct semnificativ.

Bineînțeles, această concluzie atît de diferită de cea la care am ajuns în exemplul 1 nu este rezultatul unor artificii de calcul, cum s-ar putea eventual crede judecînd după faptul că datele cifrice înregistrate inițial au fost, în ambele exemple, exact aceleași. Ea se datorește numai modului diferit de organizare a experiențelor, după o schemă care a permis să se atenueze influența sursei de erori celei mai frecvent întîlnite în cercetările biologice — neomogenitatea loturilor experimentale, și aplicării metodei de calcul statistic proprii acestei noi scheme.

Cît privește modul de prezentare finală a rezultatelor, și aici ar fi suficient să se dea numai cele două medii experimentale și să se indice fie $P < 0{,}01$, fie $DL_{0{,}01} = 1{,}23$, menționîndu-se totodată că experiența s-a efectuat prin metoda perechilor.

Folosim acest prilej ca să reamintim că pentru a putea beneficia de avantajele pe care le oferă metoda perechilor nu este neapărat necesar ca determinările din cele două variante (martor și tratată) să se efectueze pe cîte un același subiect (om, animal, plantă). Adeseori acest lucru nici nu este posibil, dacă însăși natura cercetărilor implică distrugerea lui. În asemenea cazuri se poate recurge însă la perechi de cîte doi indivizi cît mai asemănători cu putință. Constituirea unor astfel de perechi este, evident, cu mult mai ușoară decît obținerea unor loturi mari, omogene.

Mai menționăm în treacăt că un alt mijloc de a înlătura influența neomogenității loturilor, și anume în cazurile cînd factorii care o determină pot fi exprimați cifric, consistă în prelucrarea rezultatelor experimentale după regulile analizei covarianței, care, după cum se știe, permit să se stabilească ce anume rezultate s-ar obține dacă neuniformitățile inerente materialului biologic folosit ar dispare. Nu este însă locul să insistăm aici asupra acestor chestiuni speciale, a căror expunere nici nu are o legătură directă cu problema care ne preocupă aici, aceea a greșelilor celor mai elementare de calcul statistic care se mai întîlnesc în unele lucrări de biochimie.

Exemplul 3. Una dintre aceste greșeli consistă în prelucrarea rezultatelor unor experiențe mai complexe prin metode de calcul statistic corespunzătoare numai unor scheme de experimentare simple. De exemplu, în experiențe cu o variantă martor și mai multe variante de tratament, acestea din urmă sînt comparate adeseori pe rînd, prin calcul statistic, numai cu varianta martor, cu respectarea mai mult sau mai puțin scrupuloasă a regulilor corespunzătoare comparației între două medii experimentale independente. Nu se face însă și o comparație statistică între variantele tratate, dar concluziile se formulează fără să se țină seamă de această lipsă, ceea ce, bineînțeles, poate duce la erori de interpretare.

Se întîlnesc, de pildă, cazuri de tipul celui arătat în tabela nr. 3, unde presupunem că ar fi vorba de o experiență cu un grup de organisme practic omogen, împărțit în 4 loturi de cîte 5 indivizi, din care 3 loturi au fost supuse unui tratament cu cantități progresive c_1, c_2, c_3 dintr-o substanță stimulatoare, urmărindu-se efectele acesteia asupra activității unei enzime oarecare.

Tabela nr. 3

Efectele unui tratament cu cantități progresive (c_1, c_2, c_3) de substanță stimulatoare, asupra activității unei enzime (exemplu de prezentare greșită a rezultatelor)

Martor	Loturi tratate		
	c_1	c_2	c_3
24	30	32	29
27	27	30	27
22	31	32	25
24	29	29	30
23	26	27	28
Media 24,0	28,6	30,0	27,8
s 1,87	2,07	2,12	1,92
P	0,01	0,01	0,01—0,02

Pe baza modului cum și-a prelucrat prin calcul statistic rezultatele experimentale înscrise în tabela nr. 3, autorul respectiv a formulat concluzii de următorul gen :

— în toate dozele încercate, substanța studiată a exercitat un efect de stimulare a activității enzimatice ;

— efectul de stimulare cel mai pronunțat s-a constatat la doza c_2, pe cînd în cazul dozei mărite c_3 acest efect, deși pozitiv, a fost totuși ceva mai slab chiar decît în cazul dozei minime c_1.

Dintre aceste concluzii, prima este evident justă, deși autorul s-a folosit de o schemă de calcul neadecvată schemei experimentale adoptate, cum arată însuși faptul că a calculat

abaterea standard a fiecărei variante în parte, deşi numărul repetiţiilor era mic. S-a făcut aşadar, în cazul de faţă, o greşeală de felul celei discutate în exemplul 1 de mai sus.

Cea de-a doua concluzie nu are însă nici o bază sigură, deoarece autorul nu a efectuat nici un fel de calcule care să demonstreze că între valorile medii obţinute cu cele trei doze ar exista diferenţe statistic semnificative. El şi-a formulat-o pe temeiul simplei comparaţii între valorile medii ca atare, cu ignorarea dispersiei rezultatelor individuale.

În experienţe ca cea de mai sus, care comportă comparaţii multiple între mai multe variante, concluzii statistic asigurate se pot obţine numai dacă datele înregistrate se prelucrează după regulile analizei varianţei. Aşadar, într-un asemenea caz este necesar să separăm mai întîi abaterile datorite eventualului efect al tratamentelor, de acelea aferente erorilor experimentale propriu-zise (neuniformitatea loturilor etc.), să calculăm apoi varianţele respective, ţinînd seama de gradele de libertate corespunzătoare, să comparăm între ele aceste varianţe pentru a vedea dacă raportul lor (F) duce sau nu la concluzia că în cadrul experienţei executate ar exista diferenţe semnificative între cel puţin două dintre diversele valori medii înregistrate, iar în caz că răspunsul este afirmativ, să calculăm, plecînd de la varianţa erorilor, diferenţa limită semnificativă dintre două medii şi, cu ajutorul acesteia, să stabilim în sfîrşit între care anume dintre varianţele studiate sînt deosebiri statistic asigurate.

Pentru a putea interpreta corect rezultatele experienţei de mai sus, calculele ar urma să fie deci efectuate în felul următor:

Calculăm suma pătratelor abaterilor totale pentru ansamblul celor $N = 20$ valori experimentale x înregistrate:

$$SP_{tot.} = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}. \tag{10}$$

În cazul de faţă găsim că $SP_{tot.} = 162{,}8$.

Calculăm apoi suma pătratelor abaterilor aferente efectului tratamentelor:

$$SP_{trat.} = \frac{\Sigma x_c^2}{n} - \frac{(\Sigma x)^2}{N} \tag{11}$$

în care x_c reprezintă suma celor $n = 5$ valori experimentale observate în fiecare variantă luată în parte. Găsim astfel $SP_{trat.} = 98{,}8$.

În cazul unei experienţe monofactoriale cum este cea de mai sus, diferenţa $SP_{tot.} - SP_{trat.}$ reprezintă, cum se ştie, suma pătratelor abaterilor aferente erorilor experimentale SP_{erori}. Valoarea acestei sume este aici $SP_{erori} = 162{,}8 - 98{,}8 = 64{,}0$.

Plecînd de la aceste sume, calculăm în sfîrşit varianţele s^2 corespunzătoare pe de o parte efectului tratamentelor şi pe de alta influenţei erorilor, ţinînd seama de numărul gradelor de libertate GL respective şi folosind relaţia generală:

$$\frac{SP}{GL} = s^2. \tag{12}$$

Cum în experienţa de mai sus $GL_{tot.} = N - 1 = 20 - 1 = 19$, iar $GL_{trat.} = 4 - 1 = 3$, şi ştiind că între gradele de libertate există aceeaşi relaţie de însumare ca între sumele pătratelor abaterilor, adică $GL_{tot.} = GL_{trat.} + GL_{erori}$, numărul gradelor de libertate corespunzătoare erorilor GL_{erori} va fi $19 - 3 = 16$. În consecinţă, varianţa s^2 corespunzătoare efectului tratamentelor va fi egală cu $98{,}8/3 = 32{,}93$, aceea corespunzătoare erorilor va fi egală cu $64{,}0/16 = 4{,}00$, iar raportul F dintre aceste două varianţe va fi egal cu $32{,}93/4{,}00 = 8{,}23$.

Pentru a vedea acum dacă între diversele valori medii înregistrate în variantele experienței examinate se găsesc sau nu diferențe semnificative, comparăm valoarea experimentală a lui F cu cea teoretică ce corespunde gradului de semnificație pe care ni-l alegem și numărului gradelor de libertate pe care se bazează cele două variante comparate (3 și 16). Pentru $P = 0,05$, cunoscuta tabelă a lui Snedecor dă în acest caz $F = 3,24$, iar pentru $P = 0,01$ găsim $F = 5,29$. Valoarea raportului F experimental fiind superioară acestor două valori teoretice, deducem că în cadrul experienței s-au înregistrat diferențe nu numai semnificative ($P = 0,05$), ci chiar distinct semnificative ($P = 0,01$).

Rezultatele analizei variației, efectuată în felul acesta, sînt deci cele arătate în tabela nr. 4.

Tabela nr. 4

Analiza varianței pentru experiența din tabela nr. 3

Cauza abaterilor	SP	GL	s^2	$F_{exp.}$	$F_{0.01}$
Tratamente	98,8	3	32,93	8,23	5,29
Erori	64,0	16	4,00		
Total	162,8	19			

Așa fiind, examenul rezultatelor experienței urmează să fie continuat, ca să descoperim între care variante anume se găsesc diferențe semnificative sau distinct semnificative. În acest scop, plecînd de la varianța erorilor, vom calcula după relațiile (5) și (6) mai întîi varianța s_d^2 a diferenței între două medii, apoi abaterea standard s_d a acestei diferențe, știind că fiecare dintre mediile comparate provine din cîte $n = 5$ valori individuale. Găsim astfel $s_d^2 = 1,60$ și $s_d = 1,265$.

Mai rămîne să calculăm cu ajutorul lui s_d diferența limită semnificativă, folosindu-ne de relația (7). Valoarea lui t din această relație o căutăm în tabela respectivă, în funcție de gradul de semnificație ales și de numărul gradelor de libertate pe care se bazează varianța erorilor (aici 16). Pentru $P = 0,05$ tabela indică $t = 2,12$, pentru $P = 0,01$ găsim $t = 2,92$, iar pentru $P = 0,001$ găsim $t = 4,02$, așa că $DL_{0.05} = 1,265 \cdot 2,12 = 2,68$, iar $DL_{0.01} = 1,265 \cdot 2,92 = 3,69$ și $DL_{0,001} = 1,265 \cdot 4,02 = 5,09$.

Comparînd aceste diferențe limită cu cele realmente existente între valorile medii înscrise în tabela nr. 3, constatăm că :

— valorile medii obținute în variantele de tratament c_1 și c_3 întrec cu mai mult de 3,69, iar cea obținută în varianta c_2 chiar cu mai mult de 5,09 media înregistrată la martor, așa că efectul tratamentului se dovedește a fi distinct semnificativ pentru dozele c_1 și c_3 și foarte semnificativ pentru doza c_2 ;

— diferențele dintre valorile medii corespunzătoare efectului acestor trei doze nu ating însă în nici unul din cazuri valoarea minimă 2,68, corespunzătoare pragului uzual de semnificație $P = 0,05$, și, prin urmare, nu sînt semnificative, ci întîmplătoare.

Reiese deci de aici că cea de-a doua concluzie formulată mai înainte de autorul lucrării pe care o analizăm nu era justificată.

Toate acestea nu înseamnă însă că efectele celor trei doze nu ar putea fi într-adevăr diferite, ci numai că experiența de mai sus nu a putut aduce o dovadă certă în acest sens.

Cît privește modul de prezentare a rezultatelor acestei experiențe, ar fi suficient să se dea numai valorile medii înregistrate, notîndu-se pentru fiecare din cele corespunzătoare

loturilor tratate gradul de semnificaţie al diferenţei dintre ele şi lotul martor, prin notaţia convenţională larg răspîndită : * pentru $P = 0{,}05$,** pentru $P = 0{,}01$ şi *** pentru $P = 0{,}001$. Totodată, pentru a permite şi comparaţia între loturile tratate, este necesar să se indice şi valoarea diferenţelor limită corespunzătoare probabilităţilor de transgresiune cu care avem de-a face în cazul de faţă, astfel cum se vede în tabela nr. 5.

Tabela nr. 5

Exemplu de prezentare corectă a rezultatelor experienţei din tabela nr. 3 (valori medii din 5 repetiţii)

Varianta	Valoare medie	Diferenţa faţă de martor
Martor	24,0	—
c_1	28,6	4,6**
c_2	30,0	6,0***
c_3	27,8	3,8**

$DL_{0.05} = 2{,}68$
$DL_{0.01} = 3{,}69$
$DL_{0.001} = 5{,}09$

Ar mai fi de menţionat în legătură cu cele de mai sus că, într-un caz ca cel de faţă, indicarea numai a valorilor lui P corespunzătoare diferenţelor dintre fiecare din mediile înregistrate la loturile tratate şi media martorului nu este suficientă, deoarece nu permite şi o comparaţie directă între loturile tratate. Această din urmă comparaţie este posibilă numai dacă dispunem de valorile DL. *)

Exemplul 4. Riscul alunecării pe panta afirmaţiilor nefondate este încă mai mare în cazul prelucrării simpliste a rezultatelor unor experienţe polifactoriale, în care, pe lîngă efectele diverşilor factori de intervenţie, se pot manifesta şi anumite efecte ale interacţiunilor lor.

*) Aceeaşi schemă generală de calcul se aplică şi atunci cînd numărul indivizilor din loturile experimentale nu este egal, ci diferit, deci cînd numărul total N al rezultatelor înregistrate nu este un multiplu al celor n rezultate din fiecare variantă, ci o sumă de $n_1 + n_2 + n_3 + \ldots$. rezultate. În astfel de cazuri $SP_{\text{tot.}}$ se calculează tot după relaţia (10), dar pentru calcularea lui $SP_{\text{trat.}}$ trebuie să se ţină seama de numărul rezultatelor din fiecare variantă în parte, astfel că relaţia (11) devine :

$$SP_{\text{trat.}} = \sum \frac{x_c^2}{n_c} - \frac{(\sum x)^2}{N} \qquad (11')$$

unde x_c reprezintă suma celor n_c valori experimentale înregistrate într-o variantă oarecare, adică :

$$\sum \frac{x_c^2}{n_c} = \frac{\sum x_1^2}{n_1} + \frac{\sum x_2^2}{n_2} + \frac{\sum x_3^2}{n_3} + \ldots$$

O oarecare dificultate apare însă la calcularea diferenţelor limită semnificative DL, deoarece în asemenea cazuri valoarea abaterii standard s_d a diferenţei dintre două medii nu este aceeaşi pentru întreaga experienţă, ci depinde de numărul n_c al valorilor individuale din care derivă mediile ce urmează a fi comparate între ele două cîte două. Aşa fiind, abaterea standard s_d se va calcula separat pentru fiecare pereche de medii, după relaţia (6'), în care pentru s^2 se va lua varianţa comună a erorilor, găsită prin analiza varianţei în felul văzut mai sus. Desigur, într-o experienţă cu un număr mai mare de variante, toate aceste calcule iau un timp îndelungat şi comportă o muncă deloc neglijabilă. De aceea este de preferat să ne organizăm experienţele de acest tip în aşa fel încît fiecare din variantele experimentale să cuprindă acelaşi număr de indivizi.

Iată, de pildă, ce concluzii a desprins un cercetător dintr-o experienţă ale cărei rezultate sînt expuse în tabela nr. 6 în felul în care le-a prezentat autorul însuşi.

Tabela nr. 6

Urmărirea în timp a efectelor unui tratament (exemplu de prezentare greşită a rezultatelor)

Epoca de examinare după tratament	Varianta		*P*
	martor	tratată	
1 săptămînă	79	81	
	85	84	
	73	75	
	71	76	
Media	77	79	0,6—0,7
2 săptămîni	57	70	
	62	62	
	51	66	
	54	58	
Media	56	64	0,05—0,10
3 săptămîni	54	73	
	50	69	
	48	62	
	60	64	
Media	53	67	<0,01

Experienţa s-a efectuat în 6 variante, cu un grup relativ omogen de 24 organisme, împărţite în 4 loturi (blocuri). Din fiecare lot, 3 organisme au fost folosite ca martor, iar celelalte 3 au fost supuse unui anumit tratament, apoi, la anumite intervale de timp, cîte un exemplar martor şi un exemplar tratat din fiecare lot a fost sacrificat pentru a fi studiat.

Sprijinindu-se pe rezultatele calculelor sale statistice, autorul afirmă :

— la martor, concentraţia componentului studiat scade puternic în cursul celei de-a doua săptămîni a perioadei de experimentare, după care scăderea continuă cu o intensitate mai mică ;

— efectul tratamentului se manifestă începînd cu a doua săptămînă, şi anume în sensul frînării procesului de scădere constatat în acelaşi timp la martor ;

— în cursul celei de-a treia săptămîni, în timp ce la martor scăderea continuă, la organismele tratate acest proces nu numai că este oprit, ci începe să se manifeste chiar o creştere a concentraţiei componentului urmărit.

Examinînd tabela nr. 6, constatăm însă că cele 6 variante ale experienţei au fost comparate prin calcul statistic numai două cîte două, pentru fiecare interval de timp în parte, pe cînd comparaţia de-a lungul perioadei de experimentare, de la săptămînă la săptămînă, se bazează numai pe valorile medii, fără luarea în considerare a dispersiei valorilor individuale. Pentru acest motiv, afirmaţiile de mai sus cu privire la desfăşurarea în timp a procesului studiat sînt deocamdată discutabile.

Pentru lămurirea lucrurilor apare deci necesară o verificare statistică, în care să se ţină seama de faptul că la o experienţă polifactorială cum este aceasta urmează să se aplice şi metoda de calcul corespunzătoare, capabilă să discearnă atît influenţa fiecăruia din factorii care acţionează asupra fenomenelor investigate, cît şi pe aceea a interacţiunii lor. În cazul experienţei de faţă, în a cărei desfăşurare se reflectă acţiunea combinată a factorilor „Blocuri"

(B), „Tratament" (T) şi „Epocă" (E), suma totală a pătratelor abaterilor înregistrate ca rezultat al acestei acţiuni combinate, adică $SP_{(BTE)}$, cuprinde deci mai întîi părţile aferente acţiunii individuale a acestor factori, aşadar $SP_{(B)}$, $SP_{(T)}$ şi $SP_{(E)}$, precum şi pe acelea corespunzătoare tuturor interacţiunilor posibile dintre ei: $SP_{(B\times T)}$, $SP_{(B\times E)}$, $SP_{(T\times E)}$ şi $SP_{(B\times T\times E)}$.

Pentru interpretarea rezultatelor experienţei de faţă prezintă interes, în primul rînd, să separăm din suma totală $SP_{(BTE)}$ a pătratelor abaterilor sumele parţiale $SP_{(T)}$ şi $SP_{(E)}$, ceea ce ne va da posibilitatea să controlăm dacă acţiunea factorilor T şi E a fost sau nu semnificativă, precum şi partea $SP_{(T\times E)}$ care revine interacţiunii factorilor T şi E, aceasta din urmă permiţînd să se verifice dacă, la organismele tratate efectul tratamentului se manifestă în mod diferit, de la epocă la epocă, în comparaţie cu cele netratate.

Restul care mai rămîne astfel din totalul variaţiilor revine influenţelor datorite neuniformităţii organismelor folosite în diversele repetiţii (blocuri). Aici se însumează deci părţile $SP_{(B)}$, $SP_{(B\times T)}$, $SP_{(B\times E)}$ şi $SP_{(B\times T\times E)}$. Dintre aceste sume parţiale, o importanţă deosebită pentru interpretarea rezultatelor au acelea care corespund interacţiunilor în compunerea cărora intră simultan factorii B şi T, aşadar, în cazul de faţă, $SP_{(B\times T)}$ şi $SP_{(B\times T\times E)}$. Într-adevăr, influenţa pe care neuniformitatea blocurilor o exercită asupra acţiunii tratamentului studiat constituie tocmai „erorile" experimentale, a căror varianţă reprezintă criteriul fundamental de interpretare a rezultatelor experienţei.

Practic, suma pătratelor abaterilor aferente „erorilor", adică $SP_{(B\times T)}+SP_{(B\times T\times E)}$, se poate obţine în cazul nostru scăzînd din suma totală a pătratelor abaterilor în care intervine factorul B partea care corespunde sumei $SP_{(B)} + SP_{(B\times E)}$. Această separare a unei părţi din influenţa neuniformităţii materialului (blocurilor) este, după cum se ştie, unul din principalele avantaje ale analizei varianţei, deoarece permite să se scoată mai bine în evidenţă eventuala influenţă a celorlalţi factori principali, în cazul de faţă T şi E, ca şi interacţiunii lor $T \times E$.

Aşadar, pentru a putea trage concluziile cele mai juste din rezultatele experimentale înscrise în tabela nr. 6, urmează să fracţionăm suma totală a pătratelor abaterilor datorite acţiunii combinate a celor trei factori B, T şi E, adică $SP_{(B\times T\times E)}$, în părţile ce revin următoarelor acţiuni şi interacţiuni:

— acţiunea factorului T . . . . . $SP_{(T)}$
— „ „ E . . . . . $SP_{(E)}$
— interacţiunea factorilor T şi E . . . . . $SP_{(T\times E)}$
— partea din acţiunea factorului B care nu se răsfrînge asupra acţiunii factorului T (se denumeşte obişnuit „blocuri") . . . . $SP_{(B)} + SP_{(B\times E)}$
— partea din acţiunea factorului B care se răsfrînge asupra acţiunii factorului T („erori") . . . . . $SP_{(B\times T)}+SP_{(B\times T\times E)}$

Efectuarea practică a calculelor se desfăşoară precum urmează:

Suma totală a pătratelor abaterilor $SP_{(BTE)}$ se obţine plecînd de la toate cele $N = 24$ valori experimentale x înscrise în tabela nr. 6, conform relaţiei generale (10). Găsim astfel:

$$SP_{(BTE)} = (79^2 + 85^2 + \ldots 64^2) - \frac{(79 + 85 + \ldots . 64)^2}{24} = 2734.$$

Pentru a putea calcula apoi părţile $SP_{(T)}$, $SP_{(E)}$ şi $SP_{(T\times E)}$, vom însuma şi regrupa rezultatele experimentale din tabela nr. 6 numai în funcţie de factorii T şi E, astfel cum se vede în tabela nr. 7 *).

*) Necesitatea de a regrupa valorile experimentale în vederea punerii în evidenţă a influenţei diverşilor factori care intervin în experienţă este principala cauză datorită căreia valorificarea statistică completă a rezultatelor obţinute în experienţele polifactoriale nu este posibilă decît dacă numărul indivizilor examinaţi în fiecare variantă este acelaşi. De acest fapt trebuie să se ţină seama neapărat la planificarea şi montarea unor astfel de experienţe.

Tabela nr. 7

Însumarea și regruparea datelor experimentale din tabela nr. 6 în funcție de factorii „tratamente" și „epoci"

Epoci	Martor	Tratat	Total pe epoci
1 săptămînă	308	316	624
2 săptămîni	224	256	480
3 săptămîni	212	268	480
Total pe tratamente	744	840	Total general 1584

Această tabelă permite să se calculeze direct suma pătratelor abaterilor datorite numai acțiunii combinate a factorilor T și E, deci $SP_{(TE)}$, în care sînt cuprinse părțile $SP_{(T)}$, $SP_{(E)}$ și $SP_{(T\times E)}$:

$$SP_{(TE)} = SP_{(T)} + SP_{(E)} + SP_{(T\times E)} \tag{13}$$

Ținînd seama că fiecare din valorile înscrise în corpul tabelei nr. 7 reprezintă suma a 4 rezultate individuale, vom avea, conform relației (11):

$$SP_{(TE)} = \frac{(308^2 + 224^2 + \ldots 268^2)}{4} - \frac{1584^2}{24} = 2256.$$

Pentru a afla pe $SP_{(T)}$ folosim totalurile înscrise în ultimul rînd al tabelei nr. 7 pentru cele două variante de tratament, care însumează fiecare cîte 12 rezultate individuale, iar pentru a afla pe $SP_{(E)}$ le folosim pe acelea înscrise, pe săptămîni, în ultima coloană a acestei tabele, care însumează fiecare cîte 8 rezultate individuale. Găsim astfel:

$$SP_{(T)} = \frac{744^2 + 840^2}{12} - \frac{1584^2}{24} = 384$$

$$SP_{(E)} = \frac{624^2 + 224^2 + \ldots 480^2}{8} - \frac{1584^2}{24} = 1728.$$

Pe $SP_{(T\times E)}$ îl aflăm apoi cu ajutorul relației (13), făcînd diferența între $SP_{(TE)}$ și suma $SP_{(T)} + SP_{(E)}$:

$$SP_{(T\times E)} = 2256 - (384 + 1728) = 144.$$

Pe de altă parte, pentru a calcula părțile $SP_{(B)}$ și $SP_{(B\times E)}$ regrupăm rezultatele experimentale din tabela nr. 6 în funcție de factorii B și E, astfel cum se vede în tabela nr. 8, în

Tabela nr. 8

Însumarea și regruparea datelor experimentale din tabela nr. 6 în funcție de factorii „blocuri" și „epoci"

Epoci	Blocuri				Total pe epoci
1 săptămînă	160	169	148	147	624
2 săptămîni	127	124	117	112	480
3 săptămîni	127	119	112	122	480
Total pe blocuri	414	412	377	381	Total general 1584

fiecare bloc însumîndu-se în cazul de față cele două rezultate înscrise într-un același șir din tabela nr. 6 pentru varianta martor și cea tratată.

Tabela nr. 8 ne permite să calculăm suma totală a pătratelor abaterilor datorite acțiunii combinate a factorilor B și E, adică $SP_{(BE)}$, în care scop vom proceda ca mai sus pentru $SP_{(TE)}$, ținînd seama însă că în cazul de față fiecare din valorile înscrise în corpul tabelei nr. 8 însumează 2 rezultate individuale:

$$SP_{(BE)} = \frac{(160^2 + 127^2 + \ldots 122^2)}{2} - \frac{1584^2}{24} = 2021.$$

Știind că:

$$SP_{(BE)} = SP_{(B)} + SP_{(E)} + SP_{(B \times E)} \qquad (14)$$

putem afla acum imediat suma $SP_{(B)} + SP_{(B \times E)}$, deoarece pe $SP_{(E)}$ l-am obținut deja mai sus:

$$SP_{(B)} + SP_{(B \times E)} = 2021 - 1728 = 293$$

Mai rămîne să aflăm suma pătratelor abaterilor corespunzătoare „erorilor", adică $SP_{(B \times T)} + SP_{(B \times T \times E)}$. Pe aceasta o obținem făcînd diferența între $SP_{(BTE)}$ și $SP_{(T)} + SP_{(E)} + SP_{(T \times E)} + SP_{(B)} + SP_{(B \times E)}$:

$$2734 - (384 + 1728 + 144 + 293) = 185$$

Suma totală $SP_{(BTE)}$ a pătratelor abaterilor fiind deci astfel fracționată în părțile ce ne sînt necesare pentru interpretarea rezultatelor, urmează acum să calculăm conform relației (12) varianțele s^2 corespunzătoare, împărțind aceste sume parțiale la numărul gradelor de libertate ce revin fiecăreia din ele. După cum se știe, pentru fiecare din factorii principali care intervin într-o experiență în m moduri, acest număr este egal cu $m - 1$, iar pentru orice interacțiune acest număr este egal cu produsul gradelor de libertate ce revin factorilor principali interesați în interacțiunea respectivă.

Mai rămîne, întocmai ca în exemplul precedent (tabela nr. 4), să calculăm raportul F pentru fiecare din varianțele astfel găsite, folosind și de astădată, ca divizor, varianța „erorilor", și să comparăm valoarea experimentală a acestui raport cu cea teoretică, înscrisă în tabela lui Snedecor în funcție de numărul gradelor de libertate corespunzătoare varianțelor comparate și de gradul de semnificație pe care ni-l alegem.

În tabela nr. 9 sînt redate toate rezultatele analizei varianței efectuate în felul arătat mai sus; valorile teoretice ale raportului F corespund în acet tabel probabilității $P = 0{,}05$. Compararea lor cu valorile experimentale corespunzătoare arată imediat că în timp ce influența factorilor „tratamente" și „epoci" a fost semnificativă, aceea a interacțiunii lor, precum și aceea a „blocurilor" au fost nesemnificative, ceea ce înseamnă că în cazul de față efectul tratamentului

Tabela nr. 9

Analiza varianței pentru experiența din tabela nr. 6

Cauza abaterilor	SP	GL	s^2	$F_{exp.}$	$F_{0,05}$
Tratamente	384	1	384	18,7	5,12
Epoci	1 728	2	864	42,0	4,26
Interacțiunea tratamente × epoci	144	2	72	3,5	4,26
Blocuri	293	9	32,55	1,1	3,20
Erori	185	9	20,55		
Total	2 734	23			

nu a fost alterat de neuniformitatea blocurilor și că sensul în care concentrația componentului studiat a variat sub influența acestui tratament nu a fost altul decît cel constatat la martorul netratat.

Concluziile generale de mai sus pot fi apoi precizate și mai amănunțit recurgînd la calcularea diferenței limită semnificative dintre două medii, pe baza varianței „erorilor", după relațiile (6) și (7). Vom avea în vedere că în cazul de față fiecare din valorile medii înscrise în tabela nr. 6 cuprinde $n = 4$ rezultate individuale și că varianța erorii bazîndu-se pe 9 grade de libertate, valoarea lui t este, după tabelă, 2,26 pentru $P = 0,05$, respectiv 3,25 pentru $P = 0,01$ și 4,78 pentru $P = 0,001$. Obținem astfel : $DL_{0,05} = 7,25$, respectiv $DL_{0,01} = 10,42$ și $DL_{0,001} = 15,32$.

Comparînd între ele, cu ajutorul acestor diferențe limită, rezultatele experimentale prezentate cum se vede în tabela nr. 10, constatăm că :

Tabela nr. 10

Exemplu de prezentare succintă a rezultatelor experienței din tabela nr. 6 (valori medii din 4 repetiții)

Epoca de examinare după tratament (săptămîni)	Martor		Varianta tratată		
	Media	Diferența față de epoca precedentă	Media	Diferența față de	
				martorul din aceeași epocă	varianta tratată din epoca precedentă
I	77	—	79	+2	—
II	56	−21***	64	+ 8*	−15**
III	53	− 3	67	+14**	+ 3

$DL_{0,05} = 7,25$
$DL_{0,01} = 10,42$
$DL_{0,001} = 15,32$

— influența tratamentului se manifestă semnificativ din a doua săptămînă de la aplicarea lui și devine distinct semnificativă pînă la sfîrșitul perioadei de experimentare;

— scăderea constatată la martor între săptămîna a 2-a și a 3-a, ca și creșterea constatată în același timp la varianta tratată sînt întîmplătoare și statistic neasigurate.

S-ar putea totuși ca, repetînd încercările după scheme care permit reducerea în și mai mare măsură a influenței neomogenității substratului folosit, cum ar fi de exemplu schema pătratului latin sau aceea a dreptunghiului latin, să se facă dovada că aceste variații de sens opus nu sînt întîmplătoare, ci corespund unor procese reale.

Nu este însă locul să intrăm aici în problema alegerii și folosirii unor asemenea scheme perfecționate, chestiunea fiind de resortul manualelor de specialitate. Cîteva din cele mai larg folosite dintre ele figurează în bibliografia de mai jos. Scopul rîndurilor de față a fost numai să atragă atenția celor care încă nu sînt îndeajuns de rutinați în calculul statistic că folosirea lui judicioasă este o necesitate de neînlăturat și că aprofundarea lui este cheia valorificării optime a rezultatelor experimentale, obținute adeseori numai după o muncă îndelungată și grea.

Institutul de cercetări
pentru cereale și plante tehnice,
Fundulea-București
Secția de chimie și tehnologie agricolă

Prezentată la redacție la 3 aprilie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Bailey N. T., J. *Statistical methods in biology*, ed. Collet's Holdings, London, 1959.
2. Ceapoiu N., Itoafă E., *Elemente de tehnică experimentală agricolă. Partea I*, Ed. Academiei R.S.R., București, 1959.
3. Cochran W. G., Cox G. M., *Experimental designs*, ed. a 2-a, Wiley & Sons, New York, 1957.
4. Finney D. Y., *Statistical method in biological assay*, Charles Griffin, London, 1952.
5. Fisher R. A., *Statistical methods for research workers*, ed. a 13-a, Oliver & Boyd, Edinburgh, 1954.
6. Săhleanu V., *Metode matematice în cercetarea medico-biologică*, Ed. medicală, București, 1957.
7. Sison L., *Statistique appliquée à la biologie expérimentale*, Gauthier-Villars, Paris, 1958.
8. Snedecor G. W., *Statistical methods*, ed. a 5-a, Iowa State Coll. Press, Ames, Iowa, 1957.
9. Vessereau A., *Méthodes statistiques en biologie et en agronomie*, Baillière et Fils, Paris, 1948.
10. Weber E., *Grundriss der biologischen Statistik*, ed a 2-a, G. Fischer, Jena.
11. Worthing A. G., Geffner J., *Prelucrarea datelor experimentale*, Ed. tehnică, București, 1959.

LABORATORIUMSTECHNIK FÜR BIOCHEMIKER, herausgegeben von Dr. Bořivoj Keil, D. Sc. und Dr. Zora Šormová, D. Sc. unter mitartbeit von Keil Bořivoj, Ing. Dr. Techn., D. Sc. — Šormová, Zora, Ing. Dr. Techn., D. Sc. — Mikeš, Otokar, Ing. Dr. Techn. — Kleinzeller, Arnošt, Doz. MU Dr. RNDr. D. Sc. — Grünberger, Desider, Ing. C. Sc. — Rychlík, Ivan, MUDr., C. Sc. — Knessl, Otto, ing. — Řiman, Josef, MUDr., C. Sc. — Tomášek, Vladimir, Ing., C. Sc. — Šebesta, Karel, Ing. Dr. Techn., — Černá, Jiřina, Ing., C. Sc. — Tykva, Richard, Ing., C. Sc. — Sedláček, Blahoslav, Ing., C. Cs. — Bartl, Pavel, Ing., C. Sc. — Šponav, Jaroslav, Ing., C. Sc. — Munk, Petr, Ing., C. Sc. — Prokopová, Eva, Ing., C. Sc., sämtliche in Prag. Leipzig 1965, Akademische Verlagsgesellschaft Geest u. Portig K.—G.

La începutul anului 1965 a apărut în R.D.G. ediția germană a manualului Laboratorni Technika Biochemie („Tehnica de laborator pentru biochimiști"), editat de Dr. Borivoj Keil, D. Sc. și Dr. Zora Šormová, D. Sc.

Acest manual pune la îndemîna specialiștilor (cercetători și cadre didactice) informații de bază asupra celor mai diferite metode biochimice.

Autorii s-au străduit să analizeze acele procedee de lucru care, din cauza generalității lor, nu se găsesc în literatura de specialitate, dar care pentru biochimie sînt specifice. La metodele speciale autorii arată însemnătatea lor, dificultățile ce pot apărea și domeniul lor de aplicabilitate. Nu tuturor metodelor li s-a acordat aceeași extindere, îndeosebi au fost mai aprofundate acele domenii în care autorii au o experiență personală : e vorba în special de substanțele proteice și acizii nucleici.

În alcătuirea tematicii s-a ținut seama ca, pe lîngă principiul metodei, descrierea generală a aparaturii și a modului de lucru, să se dea și un exemplu practic, ilustrativ, tipic pentru metoda discutată ; se fac de asemenea utile recomandări de lucru.

Manualul cuprinde 925 pagini, 341 figuri, 120 tabele și 4166 indicații bibliografice, care sînt înscrise la fiecare capitol în parte ; în legătură cu bibliografia, trebuie subliniat că tratatele, monografiile și lucrările de ansamblu sînt înscrise separat de lucrările originale, ceea ce vine în ajutorul cititorului.

Manualul cuprinde două părți : prima, intitulată „Parte generală", alcătuită din șase capitole, iar a doua „Parte specială" desfășurată pe unsprezece capitole.

În primul capitol al părții generale se dau indicații pentru utilarea unui laborator de biochimie, începînd cu instalațiile de bază și trecînd în revistă aparatura de lucru necesară ; nu sînt omise nici sistemele pentru menținerea constantă a temperaturii, umidității și iluminării.

Următorul capitol trece în revistă tehnicile de lucru fundamentale, adecvate ma erialului biologic, începînd cu sfărîmarea, omogenizarea, filtrarea, centrifugarea, dializa, ultrafiltrarea etc. și trecînd la tehnici de separare cu ajutorul schimbătorilor de ioni, cromatografie, electromigrare. Capitolul se încheie cu descrierea unor sisteme de mecanizare și automatizare a operațiilor de laborator.

Metodele fizico-chimice de analiză constituie cuprinsul celui de al treilea capitol, și anume metode electrochimice (potențiometrie și măsurări de pH, conductometrie, polarografie și electroforeză ; metode optice (polarimetrie, spectrofotometrie și colorimetrie, refractometrie, determinări de constantă de difuzie și metode bazate pe dispersia luminii), și alte metode, ca vîscozimetrie, osmometrie, determinare de tensiune superficială și microscopie electronică.

În capitolul al IV-lea sînt descrise metodele manometrice şi de difuzie şi utilizarea lor analitică. Capitolul cuprinde un amplu tabel cu cele mai importante metode manometrice de analiză.

Următorul capitol tratează despre metodele de lucru cu izotopii radioactivi.

Partea întîi a cărţii se încheie cu capitolul al şaselea, în care se dau indicaţii utile de prelucrare a datelor experimentale, ca : evaluarea rezultatelor, înscrierea grafică a rezultatelor şi calculul statistic.

Trecînd la partea a doua a manualului, intitulată „Parte specială", capitolul şapte se ocupă de proprietăţile proteinelor şi ale acizilor nucleici, după ce tratează clasificarea şi constituţia lor chimică.

Capitolele VIII şi IX le putem socoti strîns înrudite ca tematică, primul tratînd modul de prelucrare a materialului biologic pentru obţinerea diferiţilor compuşi biochimici ca aminoacizi, peptide, zaharuri, zaharuri fosforilate, nucleotide, nucleoproteine şi acizi nucleici, coenzime, lipide şi componentele lor ; iar cel de al doilea trecînd în revistă metodele analitice de determinare a compuşilor şi componentelor amintite.

Capitolul X descrie metodele de cercetare şi de determinare a structurii proteinelor şi de modificare a moleculelor acestora. Sînt analizate metodele care sînt utilizate azi pentru cercetarea microstructurii proteinelor (grupele caracteristice de la cele două capete ale lanţului peptidic, punţi sulfidice, legătura grupelor prostetice, secvenţa aminoacizilor etc.). În continuare se tratează problema modificării structurii proteinelor în vederea găsirii legăturii dintre structura chimică şi activitatea biologică, a obţinerii unor derivaţi care să înlesnească cercetarea macro- şi microstructurii proteinelor, a preparării din proteinele naturale a unor compuşi medicinali (ca : înlocuitori de plasmă, preparate enzimatice etc.) şi în vederea obţinerii de compuşi proteici cu proprietăţi mecanice noi (este vorba de produşi şi fibre sintetice, de care industria are nevoi crescînde).

„Activitatea enzimatică" este intitulat articolul XI al manualului, şi acest domeniu este privit sub toate aspectele ; noţiuni de bază, condiţii optime pentru măsurarea activităţii, principii generale ale determinării activităţii etc. Apoi sînt descrise diferite metode de determinare : colorimetrice, titrimetrice, cromatografice, manometrice, vîscozimetrice.

În capitolul XII sînt descrise diferite tehnici de lucru pentru obţinerea materialului biologic, în vederea cercetării, metode de obţinere de felii de ţesuturi, suspensii, omogenate, precum şi izolări şi identificări de diferite fracţiuni celulare ; sînt menţionate mai departe moduri de cercetare morfologică, biochimică şi biologică a componentelor celulare izolate.

În continuare, capitolul XIII tratează problema localizării enzimelor în ţesuturi şi celule, ceea ce vine în sprijinul histo- şi citochimiei. În subcapitolele următoare se descriu metodele microbiologice generale şi metode tehnice de adaptare enzimatică ; teste imunochimice. Capitolul se încheie cu descrierea diferitelor metode de conservare a materialului biologic.

Începînd cu capitolul XIV şi în următoarele trei se dă, sub formă de tabele cuprinzătoare, o vedere de ansamblu asupra următoarelor probleme : obţinerea proteinelor (tabelul cuprinde proteina, materialul din care se obţine şi indicaţia bibliografică), constante de bază fizico-chimice ale proteinelor, componenţa hidrolizatelor proteice ; unul din capitole cuprinde 17 tabele cu amestecuri tampon.

Manualul are la sfîrşit o tablă de materii cuprinzătoare, care ajută la consultare.

Considerăm că este un manual de valoare şi un ghid preţios pentru lucrătorii din domeniul biochimiei.

Frunzeti Viorica
Institutul de biochimie al Academiei R.S.România

E. B. Skvirskaia, O. P. Cepinoga, *Praktikum po nukleoproteidam i nukleinovim kislotam* (Metode de cercetare a nucleoproteidelor și acizilor nucleici), Editura „Visșaia școla", Moscova, 1964.

În ultimii ani, cercetările care se fac în domeniul nucleoproteinelor, acizilor nucleici și a derivaților lor au luat o amploare deosebită datorită faptului că astfel de compuși participă la o serie de fenomene importante în biologie, cum sînt ereditatea, sinteza proteinelor specifice ș.a. De asemenea, aplicarea în biologie a cuceririlor contemporane ale chimiei, fizicii, chimiei fizice și altor discipline a dus la intensificarea ritmului de cercetare și la dezvoltarea cercetărilor biochimice în acest domeniu.

Cunoștințele noastre actuale asupra compoziției și structurii acizilor nucleici s-au îmbogățit cu datele furnizate prin aplicarea unor metode moderne ca ultramicroscopia, electroforeza, cromatografia, analiza roentgenografică a structurilor, metoda izotopilor radioactivi etc.

Cu toate acestea, se resimte lipsa unor manuale care, reunind laolaltă metodele destinate studiului acizilor nucleici, ar ușura munca cercetătorilor în alegerea celei mai potrivite metode în cercetarea biochimică de laborator.

De aceea, E. B. Skvirskaia și O. P. Cepinoga au considerat necesară umplerea acestui gol existent în literatura biochimică, prin editarea cărții „Metode de cercetare a nucleoproteinelor și acizilor nucleici", apărută de curînd la Moscova. Cartea prezintă — în cele 213 pagini — o serie de metode biochimice de obținere preparativă și de analiză a nucleoproteinelor și acizilor nucleici din țesuturile animale, alese după o muncă laborioasă dusă de autori în decursul anilor, în domeniul biochimiei acizilor nucleici. De altfel, O. P. Cepinoga este și autorul cunoscutei cărți, traduse încă din 1958, în limba română „Acizii nucleici și rolul lor în biologie" (edit. medicală).

În introducere se arată, pe scurt, structura acizilor nucleici și se argumentează importanța alegerii celor mai potrivite metode de cercetare în acest domeniu.

Capitolul I tratează despre obținerea nucleoproteidelor, acizilor nucleici și a produșilor de descompunere. În acest capitol se găsesc descrise: extragerea și purificarea dezoxiribonucleoproteidelor și acidului dezoxiribonucleic din țesuturi animale, extragerea și purificarea ribonucleoproteidelor și acidului ribonucleic din drojdii și țesuturi animale, extragerea acizilor ribonucleici specifici din fracțiunile celulare, extragerea și purificarea acizilor nucleici (ADN și ARN) din țesuturi animale, obținerea preparativă și purificarea unor derivați ai acizilor nucleici.

Capitolul II cuprinde metodele de determinare cantitativă a acizilor nucleici: prin fosfor și prin carbon (reacții colorate). Determinarea acizilor nucleici și a produșilor lor de scindare prin baze azotate: metode spectrofotometrice fără scindarea lor prealabilă, metode cromatografice de cercetare a acizilor nucleici, electroforeza pe hîrtie a acizilor nucleici.

Capitolul III este consacrat separării acizilor nucleici și a derivaților lor pe schimbători de ioni. Se descrie separarea ADN și ARN pe calea absorbției pe cărbune, separarea nucleotidelor prin absorbție pe cărbune, cromatografia pe coloană de fosfat de calciu, separarea componentelor acizilor nucleici pe Sephadex, separarea nucleotidelor, nucleozidelor și bazelor ARN pe Dowex, fracționarea proteidelor ADN din țesuturi animale pe coloane de schimbători de ioni, separarea cromatografică a nucleotidelor pe schimbători de ioni celulozici, separarea acizilor adenozin-fosforici pe coloană din anioniți indigeni. De asemenea, se dau metodele de preparare a coloanelor cromatografice din albumină serică bovină metilată pentru analiza acizilor nucleici, metodele de fracționare a ADN pe schimbători de ioni proteici, de separare a

derivaţilor acizilor nucleici prin cromatografie în strat subţire, ca şi metoda de determinare a greutăţii moleculare a acizilor nucleici prin vîscozimetrie.

Capitolul IV este dedicat obţinerii şi purificării unor enzime de depolimerizare a acizilor nucleici. Sînt date metodele pentru ribonuclează şi dezoxiribonuclează din diferite ţesuturi animale.

Capitolul V cuprinde determinarea activităţii enzimelor de depolimerizare a acizilor nucleici. Se descriu metodele de determinare a activităţii ribonucleazei prin produşii acidosolubili de descompunere a ARN, prin formarea grupărilor acide titrabile, metode manometrice, turbidimetrice, în analizele de serie. De asemenea, se descriu metodele de determinare a activităţii dezoxiribonucleazei prin produşii acidosolubili de descompunere a ADN, prin scăderea vîscozităţii amestecurilor de cercetat, prin legarea verdelui de metil, prin formarea grupărilor acide. Sînt date metodele spectrofotometrice şi turbidimetrice de determinare a activităţii dezoxiribonucleazei. Tot aici mai sînt cuprinse metode de determinare a dezoxiribonucleazei în urină, în cazul analizelor de serie, ca şi determinarea activităţii sintezei fermentative a poliribonucleotidelor.

Capitolul VI prezintă metoda izotopilor radioactivi, în care se descrie tehnica de lucru cu fosfor radioactiv şi metoda radioautografică.

Capitolul VII este consacrat metodelor de extragere a structurilor celulare din diferite ţesuturi animale.

Cartea se încheie cu un apendice, în care sînt descrise pe scurt unele metode biochimice curente pentru determinarea fosforului, azotului, proteinelor etc. Se dau sistemele uzuale de solvenţi pentru cromatografie pe hîrtie, pregătirea unor coloane de schimbători de ioni, unor răşini sau reactivi etc.

Bibliografia însumează 211 titluri, consultate din literatura de specialitate de dată recentă.

Valoarea cărţii se ridică prin faptul că aceste metode au fost selecţionate de autori din literatură, prin experimentarea lor, constituind astfel un ajutor deosebit de preţios pentru biochimiştii care lucrează în acest domeniu.

Corina Iordache

Institutul de biochimie al Academiei R.S.România,
Bucureşti

Sub redacţia lui J. N. Davidson şi Waldo E. Cohen: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Progrese în cercetarea acizilor nucleici şi în biologia moleculară), Vol. III, Academic Press, New York—London, 1964.

De curînd a apărut la Academic Press (New York—London, noiembrie 1964) vol. III din „Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", editat sub îngrijirea lui J. N. Davidson şi Waldo E. Cohen.

Ca şi celelalte două volume, tipărite de aceeaşi editură în 1963, volumul III constituie o reflectare a rezultatelor noi obţinute, a problemelor actuale care se pun în unele domenii de cercetare a acizilor nucleici şi biologiei moleculare. De fapt, privite în ansamblul lor, cele

3 volume din seria *Progress in Nucleic Acid Research* care, după aprecierea editorilor, constituie o continuare, reactualizare și completare a cărții „The Nucleic Acids" de E. Chargroff și J. N. Davidson (Academic Press, vol. I și II, 1955, vol. III, 1960), prin felul de tratare a subiectelor depășesc cel mai adesea caracteristicile unor lucrări de rezumare a literaturii apărute într-o anumită perioadă de timp. În ele sînt discutate și dezbătute date experimentale, ipoteze și argumente, sînt expuse experiența și părerile personale ale autorilor solicitați a redacta diferitele capitole sau subiecte pe care le conțin volumele.

Volumul III din „Progress în Nucleic Acid Research" cuprinde un număr de 8 capitole, care se referă la aspecte, uneori cu totul diferite, ale cercetării acizilor nucleici. Din această cauză, în succinta prezentare a capitolelor din acest volum, vom urma ordinea publicării lor, și anume :

— „Izolarea și fracționarea acizilor nucleici" de K. S. Kirby. Pe baza a 141 de indicații bibliografice, autorul capitolului discută metodele și condițiile de izolare, purificare și fracționare a ADN și ARN (solubil, ribozomal și mesager) de diferite proveniențe (vertebrate, nevertebrate, microorganisme și virusuri).

— Capitolul următor, scris de D. M. Prescott, se referă la „Locurile de sinteză a ARN în celulă". Sînt prezentate și discutate rezultatele recente (132 de indicații bibliografice) privind sinteza și transportul intracelular al ARN. Folosind date biochimice și citologice, autorul se ocupă de asemenea de controlul ADN în sinteza diferitelor tipuri de ARN.

— Capitolul privind „Ribonucleaza din Taka-diastază : proprietăți, natură chimică și aplicații" de F. Egami, K. Takahashi și T. Uchida (68 de indicații bibliografice) tratează între altele prepararea și purificarea RN-azelor T_1 și T_2, proprietățile și factorii care afectează activitatea lor enzimatică, structura primară a RN-azei T_1, precum și folosirea acestor enzime în chimia preparativă și analitică a acizilor nucleici.

— „Efectele chimice ale radiațiilor ionizante asupra acizilor nucleici și a compușilor înrudiți" de J. J. Weiss. Folosind 71 de indicații bibliografice, autorul ia în discuție mecanismul de acțiune și modificările chimice produse de radiațiile ionizante la nivelul diferitelor componente ale acizilor nucleici : pirimidine, purine, nucleotide și nucleozide. Se discută, de asemenea, efectele fizice și chimice ale radiațiilor ionizante asupra nucleoproteinelor.

— În „Reglarea sintezei ARN la bacterii", F. C. Neidhardt analizează (pe baza a 76 de referințe) felul în care are loc, cine produce și importanța reglării sintezei ARN ribozomal, solubil și mesager, din celulele bacteriene. Autorul prezintă totodată o nouă metodă pentru cercetarea mecanismului reglării, prin folosirea unor mutanți termo-sensibili.

— E. Reich și I. H. Goldberg semnează capitolul privind „Actinomicina și funcția acizilor nucleici" (181 de indicații bibliografice). În acest capitol sînt discutate și analizate bazele moleculare ale acțiunii actinomicinei, acordîndu-se totodată o atenție deosebită folosirii acestui antibiotic în cercetarea acțiunii genelor ce controlează formarea acizilor nucleici, proteinelor enzimatice și hormonale etc.

— „Sinteza *de novo* a proteinelor *in vitro*" de B. Nisman și J. Pelmont. Pornind de la definiția sintezei *de novo*, autorii analizează (253 de indicații bibliografice), diferitele aspecte ale cercetării sintezei proteinelor atît *în vivo* cît mai ales *in vitro*. Se discută mecanismul formării lanțurilor polipeptidice, a unor proteine animale și vegetale, precum și unele enzime din *E. coli*, în sisteme lipsite de celule.

— Ultimul capitol „Nucleotidele libere din țesuturile animale" de P. Mandel, se referă la rolul metabolic al diferitelor nucleotide, metodele de separare și identificare a acestora, distribuția în țesuturi, precum și modificările lor cantitative în funcție de stările funcționale ale organismului animal. Autorul capitolului utilizează 438 de indicații bibliografice.

Ca o apreciere generală a întregului volum, putem spune că toate capitolele sînt clar redactate, la un nuvel înalt, bogat ilustrate cu rezultate experimentale cuprinse în tabele şi grafice, cu scheme şi fotografii.

Remarcînd numărul mare de indicaţii bibliografice (1 360) şi mai ales felul de tratare a problemelor, superior faţă de lucrările rezumative sau monografice, credem că volumul III — ca şi celelalte două volume din seria „Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology" — este deosebit de util şi de un real folos pentru toţi acei care lucrează în domeniul cercetării acizilor nucleici sau în domenii înrudite.

Vasu Sabin Sorin

Cercetător principal la Institutul
de biochimie al Academiei R.S.România,
Bucureşti

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări științifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc. *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : str. Docenților, nr. 20, București 2, Raionul 30 Decembrie.

1965 DEC 18

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R. S. ROMÂNIA

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice,** 339 p., 16 lei.

C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI şi I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice,** 96 p., 3,65 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele,** 429 p., 22,80 lei.

R. PORTOCALĂ şi N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi intramicrobiologie,** 180 p., 9,90 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN şi N. CARP, **Histochimia mucopolizaharidelor,** 284 p. + 24 pl., 20 lei.

C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală,** vol. I, 747 p. + 4 pl. + 2 pl. color, 41 lei.

I. CANTACUZINO, **Opere alese,** 687 p. + 4 pl. color, 44 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 8, NR. 3, P. 251 — 368 BUCUREŞTI, AUGUST 1965

I. P. Informaţia — c. 2505

43816

Lei 12.—

E 1330

studii şi cercetări de biochimie

4

TOMUL 8
1965

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 4, p. 369—492, Bucureşti, decembrie 1965

1883

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil :

ACADEMICIAN E, MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct :

H. SLUȘANSCHI

Membri :

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; M. MEZINCESCU ; I. VASILESCU, TR. RĂDULESCU ; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție :

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin : CARTIMEX, Căsuța poștală 134 — 135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI :

București, *Str. Docenților nr. 20,*
Raionul 30 Decembrie

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 8 (1965) nr. 4

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Materia vie şi distribuţia asimetrică a electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial (Bazele teoriei structurii şi compararea lor cu bazele teoriilor membranei şi sorbţiei) 371

G. NEAMŢU, V. TĂMAŞ şi C. BODEA, Cercetări asupra pigmenţilor din plante endemice. II. Carotinoidele din cîteva specii endemice hibride ale genului *Hieracium* 411

I. GONŢEA, A. RUJINSKI, S. DUMITRACHE şi P. SUŢESCU, Bilanţul calciului la om în cursul activităţii musculare 415

N. ŞT. CHIŞIU, Constituenţi antigenici proprii şi de origine sanguină în bila hepatică şi veziculară umană. Studiu imunoelectroforetic 427

I. DINU, Influenţa cantităţii şi calităţii proteinelor asupra activităţii unor enzime din ficat 441

G. FURNICĂ şi M. RADU, Modificarea conductibilităţii electrice la biopolimerii iradiaţi 451

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU şi P. G. PLOAIE, Influenţa infecţiei virotice asupra cantităţii şi calităţii conţinutului în alcaloizi din *Vinca rosea* L. (*Catharanthus roseus* G. Don) 455

N. RACOVEANU, V. STĂNCULESCU şi E. TRUŢĂ, Studiul repartiţiei ^{65}Zn în fracţiunile proteice ale serului de cobai 465

REFERAT GENERAL

C. IORDACHE, Rolul fosfagenului în procesele biochimice care stau la baza fenomenului de contracţie musculară 473

RECENZIE 487

INDEX ALFABETIC 489

St. cerc. biochimie, tomul 8, nr. 4, p. 359—492, Bucureşti, decembrie 1965

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 371–410 (1965)

MATERIA VIE ŞI DISTRIBUŢIA ASIMETRICĂ A ELECTROLIŢILOR ÎNTRE PROTOPLASMĂ ŞI LICHIDUL INTERSTIŢIAL

(BAZELE TEORIEI STRUCTURII ŞI COMPARAREA LOR CU BAZELE TEORIILOR MEMBRANEI ŞI SORBŢIEI)

ACAD. PROF. DR. EUGEN MACOVSCHI

616.6

Rezumat. — Pentru explicarea distribuţiei asimetrice a electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial se propune o nouă teorie, denumită „teoria structurii", bazată pe concepţia că această asimetrie se datoreşte integrării unei părţi a electroliţilor celulari în structura materiei vii din protoplasmă.

Noua teorie se deosebeşte de cunoscutele teorii actuale (teoria membranei şi teoria sorbţiei) atît prin postulatele sale cu privire la factorii celulari, în cadrul cărora se realizează distribuţia asimetrică a electroliţilor, cît şi prin concluziile la care ajunge în urma examinării diferitelor fapte experimentale.

Printre factorii celulari s-au luat în consideraţie natura protoplasmei, apa protoplasmei şi electroliţii celulei ; ca factori principali care ar putea să determine asimetria distribuţiei electroliţilor, au fost examinate membranele celulare (teoria membranei), însuşirile de sorbţie ale coacervatului protoplasmatic (teoria sorbţiei) şi structura materiei vii (teoria structurii) ; în fine, au fost prezentate comparativ, principalele concluzii la care ajung cele trei teorii atunci cînd analizează şi interpretează prin prisma postulatelor lor anumite fapte experimentale în legătură cu : distribuţia asimetrică a sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial, membranele celulare, energia metabolică, precum şi excitarea, lezarea reversibilă şi moartea celulelor.

Numeroase cercetări experimentale au dovedit că distribuţia electroliţilor între celulele vii şi lichidul interstiţial prezintă particularităţi remarcabile atît în privinţa naturii electroliţilor, cît şi a raporturilor cantitative dintre electroliţii aflaţi în mediile intra- şi extracelular. Pentru biologie faptul acesta este de o importanţă deosebită, deoarece particularităţile distribuţiei electroliţilor „depind de viaţa celulelor şi se modifică brusc o dată cu moartea lor. Se ştie că, în stare vie, protoplasma conţine dintre cationi mai ales potasiul, iar dintre anioni fosfaţii, pe cînd în mediul înconjurător cationul predominant este sodiul, iar anionul predominant este clorul. După moartea celulei, potasiul şi fosfaţii ies, iar sodiul şi

clorul pătrund în celulă în cantitatea necesară stabilirii echilibrului de difuzie. Asimetria distribuirii electroliţilor se datoreşte, deci, vieţii. Explicarea acestui fapt surprinzător constituie vechea problemă a teoriei permeabilităţii celulare, iar rezolvarea ei va permite cunoaşterea uneia dintre însuşirile caracteristice ale substanţei vii. De problema distribuţiei asimetrice a ionilor depinde explicarea fenomenelor bioelectrice şi teoria unuia dintre cele mai importante domenii ale fiziologiei actuale, a electrofiziologiei" [1, p. 143], privind „activitatea electrică a celulelor nervoase şi musculare, procesele de transmisie sinaptică, distribuţia ionilor şi apei între diferitele compartimente lichidiene ale corpului, reglarea pH-ului interstiţial şi intracelular, rolul transportului ionic activ atît în procesele de secreţie şi absorbţie ale tractului gastrointestinal, cît şi în formarea urinii de către rinichi" [2, p. 31] etc.

Pentru explicarea distribuţiei asimetrice a electroliţilor au fost propuse pînă acum mai multe teorii, cele mai cunoscute fiind teoria membranei şi teoria sorbţiei. Ambele au adus şi aduc contribuţii importante la cunoaşterea diferitelor fenomene fizico-chimice, biologice şi bioelectrice dependente de această distribuţie. Dar tot în acelaşi scop poate servi şi concepţia noastră despre materia vie [3]—[10], dacă admitem că structura acestei materii, prin conţinutul său în electroliţi, cauzează asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial. În adevăr, această idee duce la conturarea unei noi teorii a permeabilităţii celulare, care poate fi denumită „teoria structurii".

Deosebirile dintre teoria structurii şi teoriile membranei şi sorbţiei, precum şi particularităţile fiecăreia dintre ele, pot fi scoase în evidenţă prin prezentarea comparativă a acestor teorii. Mai întîi însă trebuie remarcat că, datorită complexităţii naturii, structurii şi funcţionării celulelor vii, cercetarea fizico-chimică a fenomenelor vieţii celulare întîmpină mari dificultăţi. De aceea, pentru înlesnirea înţelegerii acestor fenomene, se recurge de obicei la diferite postulate, mai mult sau mai puţin ipotetice, menite să simplifice elaborarea concepţiilor teoretice pe baza cărora se cercetează şi se interpretează fenomenele amintite. Astfel, fiecare teorie a permeabilităţii celulare porneşte de la anumite postulate cu privire la factorii celulari implicaţi în realizarea asimetriei distribuţiei electroliţilor, cum sînt :

1) natura protoplasmei ;
2) apa protoplasmei ;
3) electroliţii protoplasmei ;

şi scoate în evidenţă

4) factorul principal care conform teoriei respective determină distribuţia asimetrică a electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial.

În consecinţă, vom prezenta întîi postulatele celor trei teorii (A), urmînd să arătăm apoi sub forma unor „concluzii", concepţiile fundamentale, care se desprind din interpretarea diferitelor fapte experimentale în lumina postulatelor respective (B). Totodată, menţionăm că, pentru a evita citarea unei bibliografii prea vaste, ne vom referi în general la capitolul „Membrana celulară ; gradienţii ionici şi de potenţial şi trans-

portul activ" de J. Walter Woodbury, din tratatul de „Fiziologie medicală și biofizică" de Th. C. Ruth și J.F. Fulton [2] apărut în 1963, în care sînt expuse bazele teoriei membranei, și la volumul „Reacția locală a protoplasmei și excitația ce se propagă" de D. N. Nasonov [1], apărut în 1959, în care alături de unele aspecte ale teoriei membranei este expusă teoria sorbției.

A. POSTULATELE TEORIILOR MEMBRANEI, SORBȚIEI ȘI STRUCTURII

Teoria membranei

Postulatul 1.1 — Protoplasma este o soluție apoasă (lichid intracelular).

„Înainte se admitea că toți electroliții, identificabili prin analiza chimică în protoplasma vie, se află în ea sub forma unei simple soluții apoase" [1, p. 143].

„Încă de pe la mijlocul secolului trecut s-a ajuns la părerea că protoplasma celulei este o simplă soluție apoasă... Această părere este acceptată de aproape toți fiziologii contemporani" [1, p. 106].

„Din punctul de vedere al teoriei membranei, protoplasma poate fi considerată ca o soluție apoasă a diferitelor substanțe, învăluită de o membrană semipermeabilă" [1, p. 121].

„Adepții teoriei membranei consideră că, în celulă, majoritatea substanțelor se află în starea unei soluții apoase obișnuite" [1, p. 184].

„Plasma celulară sau lichidul intracelular și lichidul interstițial sînt similare; ambele lichide se compun în mare măsură din apă și ambele au un număr aproximativ egal de particule dizolvate pe unitatea de volum" [2, p. 30].

Postulatul 1.2. — Toată apa protoplasmei (lichidului intracelular) este liberă și nu se deosebește ca stare și însușiri de apa obișnuită.

Postulatul acesta rezultă din comparația bazelor teoriei membranei cu postulatele corespunzătoare (2.2 și 3.2) ale celorlalte două teorii.

Postulatul 1.3. — Electroliții protoplasmei sînt dizolvați integral în apa liberă a lichidului intracelular în care se află în stare disociată, ca ioni difuzibili.

„... teoria membranei pornește de la concepția că toți electroliții se află în protoplasmă în stare liberă, dizolvată..." [1, p. 151].

„O cerință obligatorie a teoriei membranei este reprezentată de afirmația că toate substanțele descoperite în celule, mai ales cele minerale, se află în protoplasma vie în stare dizolvată, difuzibilă" [1, p. 172].

„Teoria membranei, în forma ei clasică, pornește de la următoarele considerații: 1) în celulă toți electroliții se află sub forma unei soluții libere..." [1, p. 186].

„Totodată, teoria membranei susține că toții electroliții protoplasmei se află în ea în starea liberă dizolvată" [1, p. 108].

„Descrierea deplasării (electroliților) contra gradientului de concentrație, întîlnită adesea în literatură, se bazează pe părerea... că toți electroliții celulari se află în stare liberă, dizolvată" [1, p. 167].

„Înainte de toate, această teorie consideră că tot potasiul şi sodiul protoplasmei se află în ea sub forma unei soluţii libere" [1, p. 150].

Postulatul 1.4. — Factorul principal care determină asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă (lichid intracelular) şi lichidul interstiţial (extracelular) este membrana electrică celulară care învăluie protoplasma.

„Deoarece aceste diferenţe mari de concentraţie şi potenţial apar de o parte şi de alta a membranei electrice subţiri a celulei, este întemeiat să presupunem că această membrană joacă un rol important în menţinerea diferenţelor menţionate" [2, p. 30].

„Teoria membranei susţine că unele substanţe nu pot difuza prin membrana celulară, iar altele difuzează încet. Pe aceasta se bazează explicarea componenţei inegale a electroliţilor în protoplasmă şi mediul înconjurător (asimetria soluţiilor din celulă şi mediu)" [1, p. 172].

„Date fiind funcţiile foarte importante ale membranei celulare electrice în reglarea schimbului de ioni şi a altor substanţe, o descriere a proprietăţilor sale reprezintă un început util pentru un studiu de fiziologie". [2, p. 31].

Teoria sorbţiei

Postulatul 2.1. — Protoplasma este un coacervat complex (coacervat protoplasmatic).

„Teoria sorbţiei, propusă de noi, se bazează pe o presupunere, destul de probabilă, că protoplasma vie reprezintă un sistem de coacervate complexe" [1, p. 173].

„...din punctul de vedere al structurii coloidale, protoplasma vie reprezintă un coacervat complex" [1, p. 169].

„...protoplasma vie, după structura sa fizico-chimică, este un coacervat complex..." [1, p. 171—172].

„Noi pornim de la concepţia că protoplasma este un sistem coacervatic..." [1, p. 180].

„...noi admitem că protoplasma vie reprezintă un sistem coacervatic" [1, p. 339].

„Noi am ajuns la concluzia că majoritatea fenomenelor în legătură cu problema permeabilităţii celulare se explică bine dacă se porneşte de la concepţia că protoplasma este un sistem coacervatic complex" [1. p. 372].

„Noi admitem că protoplasma celulelor secretoare reprezintă, ca şi în celelalte celule, un sistem coacervatic..." [1, p. 178].

Postulatul 2.2. — Toată apa protoplasmei (coacervatului protoplasmatic) este legată şi de aceea se deosebeşte ca stare şi însuşiri de apa obişnuită, comportîndu-se ca o fază aparte şi ca un solvent mai slab.

„Noi pornim de la concepţia că protoplasma este un sistem coacervatic, a cărui apă se comportă ca o fază faţă de apa înconjurătoare" [1, p. 180].

„Noi am ajuns la concluzia că majoritatea fenomenelor, în legătură cu problema permeabilităţii celulare, se explică bine, dacă se porneşte de la concepţia că protoplasma este un sistem coacervatic complex, a cărui apă este un solvent slab pentru majoritatea substanţelor şi se comportă ca o fază neapoasă faţă de soluţia apoasă înconjurătoare" [1, p. 372].

„După părerea exprimată de Bungenberg de Jong și Kruyt, formarea coacervatelor se datorește micșorării încărcăturii electrice și deshidratării particulelor coloidale ale solului, ceea ce permite apropierea lor, avînd totodată loc distrugerea stratului difuz al învelișurilor lor hidrice. Rămîne numai stratul alcătuit din particule bine orientate. Straturile de apă se contopesc unele cu altele și toate particulele se înconjoară printr-un singur înveliș hidric comun. De aceea, toată apa coacervatului este legată, ceea ce explică nemiscibilitatea ei cu apa neorganizată înconjurătoare și capacitatea ei scăzută de a dizolva diferite substanțe" [1, p. 168].

„...apa coacervatelor este total legată, moleculele ei fiind orientate de micelele coacervatului" [1, p. 171].

„Noi admitem că protoplasma celulelor secretoare reprezintă, ca și în celelalte celule, un sistem coacervatic în a cărui apă multe substanțe se dizolvă remarcabil mai slab decît în apa mediului înconjurător" [1, p. 178].

Postulatul 2.3. — Electroliții protoplasmei (coacervatului protoplasmatic) sînt în parte legați stabil de proteine, în parte absorbiți reversibil pe micele coloidale și numai în parte dizolvați în apa legată a coacervatului protoplasmatic, în care se află în stare disociată ca ioni difuzibili.

„În celule, electroliții...se află în trei stări diferite:

a) Starea legăturii stabile cu protoplasma; în această stare, electroliții nu sînt disociați și nu se pretează la schimburi cu mediul exterior; în această stare se află în primul rînd majoritatea potasiului celular, majoritatea magneziului, calciului și fosfaților aflați în celule și poate o cantitate mică de sodiu.

b) Starea legăturii adsorbtive sau chimice ușor reversibile; în această stare se află o oarecare fracție a tuturor cationilor celulari.

c) Starea soluției libere, ionizată în apa protoplasmei; în această stare se află o fracție restrînsă a potasiului și fosfaților și aproape toți ionii de sodiu aflați în celulă, precum și toți ionii de clor" [1, p. 166].

„Analiza curbelor de repartiție a neelectroliților, precum și a electroliților slabi și tari, a permis să distingem trei stări, în care una și aceeași substanță se poate afla în protoplasmă: strîns legată de substratul proteic, adsorbită reversibil pe suprafețele micelare și liber dizolvată în apa protoplasmei" [1, p. 174].

„...caracterul repartiției și legării coloranților bazici și acizi în protoplasma vie amintește din multe puncte de vedere repartiția și legarea ionilor minerali în celule; și aici, ca și acolo, sînt trei forme de existență a substanței în protoplasma vie: dizolvarea liberă, sorbția ușor reversibilă și legarea relativ stabilă, aproape nereversibilă" [1, p. 142].

„Cercetarea proteinelor extrase din celule și mai ales experiențele de investigare a radioactivității ionilor marcați pătrunși în celule, dovedesc că numai o mică parte a electroliților protoplasmei se află în stare liberă; cealaltă parte fiind legată de substratul proteic, este neionizată și nedifuzibilă. Multe date arată că în felul acesta este legată cea mai mare parte a potasiului, fosforului, magneziului și calciului și, poate, o mică parte a sodiului. Numai tot clorul celular se află în stare liberă" [1, p. 172].

Postulatul 2.4. — Factorul principal care determină asimetria distribuției electroliților între protoplasmă (coacervatul protoplasmatic), și

lichidul interstiţial (extracelular) este sorbţia coacervatului protoplasmatic.

„...distribuţia substanţelor dintre celule şi mediu este determinată nu de permeabilitatea membranelor, ci de solubilitatea substanţelor în protoplasmă, de adsorbabilitatea lor pe micele şi de legarea lor chimică de către substratul proteic, adică de însuşirea de sorbţie a protoplasmei" [1, p. 180].

„În ceea ce priveşte teoria sorbţiei, ea ne dă un răspuns precis cu privire la factorii distribuţiei. Aceşti factori sînt : solubilitatea în apa protoplasmei, adsorbţia pe suprafeţele micelare ale coloizilor protoplasmei şi legarea chimică cu substratul. Toţi aceşti trei factori sînt variabili şi în mare măsură depind de starea fiziologică a protoplasmei. Prin aceasta se determină nivelul şi caracterul distribuţiei substanţelor între celulă şi mediu" [1, p. 177].

Teoria structurii

Postulatul 3.1. — Protoplasma este un ansamblu alcătuit din materie vie şi materie nevie (ansamblu protoplasmatic).

„Prin urmare, se poate admite că protoplasma este formată din două feluri distincte de materie : materia vie propriu-zisă, datorită căreia protoplasma prezintă însuşirile şi stările specific biologice amintite, şi alta, materia nevie, alcătuită din diferiţi compuşi chimici organici şi anorganici obişnuiţi, care împreună cu materia vie condiţionează viaţa protoplasmei" [4, p. 470].

Postulatul 3.2. — Apa protoplasmei (ansamblului protoplasmatic) se află sub trei forme diferite : o parte este integrată în structura materiei vii şi nu are însuşiri de solvent ; o altă parte imbibă materia vie (apa de imbibiţie) şi se comportă ca un fel de apă legată, deosebită ca fază şi ca însuşiri de solvent de apa obişnuită ; în fine, o parte se află în materia nevie a protoplasmei, comportîndu-se ca apa liberă obişnuită.

Postulatul 3.3. — Electroliţii protoplasmei (ansamblului protoplasmatic) în parte sînt integraţi în structura materiei vii, în parte sînt adsorbiţi la nivelul materiei vii şi pe coloizii aflaţi în materia nevie şi numai în parte sînt dizolvaţi, atît în apa de imbibiţie a materiei vii, cît şi în apa liberă a materiei nevii, aflîndu-se în acestea în stare disociată ca ioni difuzibili.

Postulatul 3,4. — Factorul principal care determină asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă (ansamblul protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular) este structura materiei vii.

Comparaţia postulatelor demonstrează că cele trei teorii se deosebesc profund între ele. În adevăr, fiecare atribuie protoplasmei o natură diferită, consideră în mod diferit starea şi însuşirile apei protoplasmatice, se bazează pe concepţii diferite cu privire la starea electroliţilor din protolasmă şi atribuie unor factori diferiţi rolul principal în condiţionarea asimetriei distribuţiei electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial.

B. CONCLUZIILE TEORIILOR MEMBRANEI, SORBȚIEI ȘI STRUCTURII

Acum putem trece la prezentarea principalelor concluzii la care ajung teoriile de mai sus atunci cînd analizează, interpretează și explică unele fapte și rezultate experimentale care privesc :

1) distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial ;

2) membranele celulare și repartiția ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă și lichidul interstițial ;

3) energia provenită din metabolism și distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial ; și

4) repercusiunea excitării și morții celulelor asupra distribuției asimetrice a sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial.

Examinarea faptelor experimentale care privesc distribuția altor ioni, mai ales a anionilor, precum și a faptelor experimentale din domeniul biopotențialelor electrice, urmează să formeze obiectul altor lucrări.

1. DISTRIBUȚIA ASIMETRICĂ A SODIULUI ȘI POTASIULUI ÎNTRE PROTOPLASMĂ ȘI LICHIDUL INTERSTIȚIAL

În legătură cu distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial, vom lua în considerație trei fapte experimentale, recunoscute unanim, deoarece reprezintă rezultatele unor numeroase date obținute de mulți cercetători prin metode diferite și pe material biologic variat.

I-ul fapt experimental

Cantitatea sodiului în unitatea de volum a protoplasmei este cu mult mai mică, iar cantitatea potasiului este cu mult mai mare decît în unitatea de volum a lichidului interstițial.

„Se știe că, în stare vie, protoplasma conține dintre cationi mai ales potasiu, iar dintre anioni fosfații, pe cînd în mediul înconjurător cationul predominant este sodiul, iar anionul predominant este clorul" [1, p. 143].

Al II-lea fapt experimental

Ionii de sodiu și cei de potasiu trec mai mult sau mai puțin ușor din protoplasmă în lichidul interstițial, și invers.

„În afară de aceasta, cu ajutorul metodei atomilor marcați se poate arăta că potasiul, sodiul și clorul pot pătrunde destul de repede în celule și ieși din ele..." [1, p. 108].

„Cercetările ulterioare, efectuate cu ajutorul metodei analizelor chimice directe, adesea cu aplicarea izotopilor radioactivi, au arătat că nu numai potasiul și amoniul pot pătrunde liber în fibrele musculare și se pot înlocui unul pe altul... dar tot așa și sodiul poate pătrunde repede în protoplasmă și difuza din ea afară" [1, p. 145].

Al III-lea fapt experimental

Asimetria distribuţiei sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial se menţine în tot timpul vieţii celulelor.

„Cele mai complete lucrări monografice cu privire la distribuţia ionilor dintre protoplasmă şi mediu, au fost publicate de... Din ele rezultă că distribuţia asimetrică a ionilor este o lege extrem de generală, se pare fără excepţii, şi aplicabilă la protoplasma animalelor pluri- şi monocelulare, precum şi a plantelor... Din datele respective se desprinde că compoziţia minerală a conţinutului celular se deosebeşte profund de compoziţia lichidului înconjurător" [1, p. 143].

Aceste fapte experimentale, văzute prin prisma postulatelor fiecăreia dintre teorii, duc la concluzii diferite cu privire la :

c. 1 — concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu în protoplasma şi în lichidul interstiţial ;
c. 2 — trecerea ionilor de sodiu şi potasiu din lichidul interstiţial în protoplasmă şi invers ;
c. 3 — raportul dintre concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu în protoplasmă şi în lichidul interstiţial ;
c. 4 — realizarea şi menţinerea distribuţiei asimetrice a sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial.

Teoria membranei

Teoria membranei admite că protoplasma este o soluţie apoasă (postulatul 1.1) care, în calitate de „lichid intracelular" [2, p. 30], ocupă întregul volum al celulelor ; că apa protoplasmei fiind liberă, nu se deosebeşte ca stare şi însuşiri de apa obişnuită (postulatul 1.2) şi că electroliţii sînt dizolvaţi integral în protoplasmă şi disociaţi în ioni (postulatul 1.3). În aceste condiţii, cantităţile de sodiu şi potasiu aflate în unitatea de volum a protoplasmei $(Na)_i$ $(K)_i$, exprimă totodată şi concentraţiile ionilor elementelor respective. De exemplu : în cazul celulelor musculare de mamifere, cantităţile de sodiu şi potasiu dintr-un mililitru de protoplasmă au valorile [2, p. 33] :

$$(Na)_i = 12\ \mu M/ml, \quad (K)_i = 155\ \mu M/ml \qquad (I)$$

Înseamnă că, în conformitate cu teoria membranei, aceste valori (I) reprezintă concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu în protoplasmă $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$, după cum cantităţile aceloraşi ioni dintr-un mililitru de lichid interstiţial $(Na^+)_e$ şi $(K^+)_e$ exprimă, bineînţeles, concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu $[Na^+]_e$ şi $[K^+]_e$ în acest lichid :

$$\begin{aligned} (Na)_i = [Na^+]_i = 12\ \mu M/ml \quad (K)_i = [K^+]_i = 155\ \mu M/ml \\ (Na^+)_e = [Na^+]_e = 145\ \mu M/ml \quad (K^+)_e = [K^+]_e = 4\ \mu M/ml \end{aligned} \qquad (II)$$

Dovadă că valorile din (I) reprezintă cantităţile totale sodiu şi potasiu în unitatea de volum a masei celulare (protoplasmei) rezultă din modul cum ele „sînt evaluate pe baza unei analize chimice a unei mase cunoscute de ţesut şi pe baza unei măsurători a fracţiunii de lichid

tisular care se află în spațiul interstițial. Cantitatea totală a fiecărui ion din lichidul interstițial se obține deci înmulțind concentrația interstițială cu volumul fracțional. Această cantitate este apoi scăzută din cantitatea totală de sodiu și potasiu (de ioni) din masa de țesut, pentru a se obține cantitatea de sodiu și potasiu (ioni) aflați în protoplasmă (în lichidul intracelular)" [2, p. 33—34]. (N. B. Cuvintele adăugate la textul citat sînt scrise cursiv, iar cuvintele din textul original, care au fost înlocuite, sînt puse în continuare în paranteze. Această modificare a fost necesară, deoarece textul este scris de pe pozițiile teoriei membranei, considerînd — conform postulatului 1.3 — că întreaga cantitate de sodiu și potasiu din protoplasmă se află acolo sub formă de ioni). Se înțelege că aceste cantități de sodiu și potasiu aflate în unitatea de volum a protoplasmei reprezintă concentrația ionilor lor în „lichidul intracelular" (adică în protoplasmă) numai în cazul cînd se admit postulatele. 1.1, 1.2 și 1.3.

În privința valorilor (II) este de remarcat că ele oglindesc concepția ipotetică de bază a teoriei membranei, arătată la începutul acestui subcapitol, și anume că întreaga cantitate de sodiu și potasiu din protoplasmă se află dizolvată sub forma ionizată (postulatul 1.3) în „lichidul intracelular" considerat în întregime ca o soluție de electroliți și alte substanțe în apa obișnuită (postulatele 1.1 și 1.2). În cadrul acestei ipoteze, și numai în cadrul ei, expresia „cantitățile de sodiu și potasiu din unitatea de volum al protoplasmei" are aceeași semnificație ca și expresia „cantitățile ionilor de sodiu și potasiu din unitatea de volum al protoplasmei" și poate fi înlocuită prin expresia: „concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu din protoplasmă...". Aplicînd această deducție la enunțul I-ului fapt experimental: „Cantitatea sodiului în unitatea de volum al protoplasmei este mult mai mică, iar cantitatea potasiului mult mai mare, decît în unitatea de volum a lichidului interstițial" (enunțul 1), se constată că acesta capătă forma: „Concentrația ionilor de sodiu în protoplasmă este mult mai mică, iar concentrația ionilor de potasiu mult mai mare decît în lichidul interstițial" (enunțul 2). Se înțelege că, deși în aparență enunțul 2 are aceeași semnificație ca și primul, în realitate el nu mai reprezintă enunțul unui fapt experimental, ci este enunțul unei ipoteze a cărei valabilitate depinde de valabilitatea postulatelor care stau la baza ei.

c.1. — Trecînd acum la comparația concentrațiilor ionilor de sodiu și potasiu în protoplasmă și în lichidul interstițial (II), admise de teoria membranei pe baza postulatelor 1.1, 1.2 și 1.3, se observă că aceste concentrații se deosebesc mult: în protoplasmă (lichidul intracelular) concentrația ionilor de sodiu este mică și aceea a ionilor de potasiu mare, pe cînd în lichidul interstițial (extracelular) invers: concentrația ionilor de sodiu este mare, iar a ionilor de potasiu mică (corespunzător celui de-al doilea enunț al primului fapt experimental), deși conform postulatului 1.2, solubilitatea electroliților în cele două lichide este aceeași. În adevăr, din moment ce se admite că toată apa protoplasmei este liberă și nu se deosebește ca stare și însușiri de apa obișnuită (postulatul 1.2), înseamnă că și față de electroliți ea trebuie să se comporte la fel.

c.2. — Pentru explicarea acestei asimetrii în repartiția concentrațiilor ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă și lichidul interstițial (II), se recurgea la început la ipoteza că membrana celulară ar fi impermeabilă pentru ionii menționați. Cînd însă s-a dovedit că atît ionii de sodiu cît și cei de potasiu trec mai mult sau mai puțin ușor din protoplasmă în lichidul interstițial și invers (al II-lea fapt experimental), a trebuit să se admită că membrana electrică celulară care învăluește protoplasma și o separă de lichidul interstițial (postulatul 1.4) este permeabilă pentru acești ioni.

c.3. — Or, se ştie că sistemul format din două soluţii de concentraţii diferite, separate printr-o membrană permeabilă pentru substanţele dizolvate, este în dezechilibru şi tinde să ajungă în echilibru de difuzie, prin trecerea substanţelor din soluţia concentrată în cea diluată, pînă la egalarea concentraţiilor lor în soluţiile respective. Ar fi deci de aşteptat, ca un astfel de echilibru să se stabilească şi între celule şi mediu. Cum însă asimetria repartiţiei concentraţiilor electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial se menţine tot timpul cît celulele sînt vii (enunţul al II-lea al primului fapt experimental şi cel de-al III-lea fapt experimental), înseamnă că de o parte şi de cealaltă a membranei electrice celulare persistă permanent o stare de dezechilibru ionic, cu toate că această membrană este permeabilă pentru ionii respectivi.

c.4. — Pentru a justifica acest rezultat paradoxal al deducţiilor bazate pe postulatele 1.1, 1.2 şi 1.3, teoria membranei admite că membrana electrică celulară nu numai că este permeabilă pentru electroliţi, dar mai are şi o capacitate specială de a transporta unii ioni contra gradientului de concentraţie, şi anume : ionii de sodiu din protoplasmă în lichidul interstiţial, iar ionii de potasiu în sens invers. Datorită acestei capacităţi, membrana menţionată îndepărtează permanent din celulă ionii de sodiu care pătrund în ea din lichidul interstiţial, unde concentraţia lor este mai mare, şi astfel menţine în protoplasmă concentraţia scăzută a ionilor de sodiu ; totodată, ea introduce permanent în celulă ionii de potasiu din lichidul interstiţial, unde concentraţia lor este mică, menţinînd astfel în protoplasmă concentraţia ridicată a ionilor de potasiu. Rezultă că datorită capacităţii sale speciale de a transporta continuu, selectiv şi în sensuri opuse ionii de sodiu şi de potasiu între cele două medii lichide pe care le separă, membrana electrică celulară determină şi menţine repartiţia asimetrică a concentraţiilor ionilor de sodiu şi potasiu între protoplasmă şi lichidul interstiţial, adică distribuţia asimetrică a electroliţilor între cele două medii.

Se înţelege că distribuţia asimetrică a sodiului şi potasiului, astfel realizată, se menţine atîta timp cît se menţine integritatea şi funcţia membranei electrice celulare, adică tot timpul vieţii celulei (al III-lea fapt experimental).

Pe baza acestor consideraţii, teoria membranei ajunge la următoarele concluzii :

Concluzia 1.1. — Concentraţia ionilor de sodiu în protoplasmă (lichidul intracelular) este mult mai mică, iar a ionilor de potasiu mult mai mare decît în lichidul interstiţial (extracelular) (III), deşi solubilitatea electroliţilor în cele două lichide este aceeaşi.

$$[Na^+]_i < [Na^+]_e, \qquad [K^+]_i > [K^+]_e \tag{III}$$

„Concentraţiile de sodiu $[Na^+]$ şi clor $[Cl^-]$ sînt mult mai mari în lichidul interstiţial decît în cel intracelular. Pentru potasiu $[K^+]$ situaţia este inversă : concentraţia acestuia este mai mare în lichidul intracelular decît în cel interstiţial" [2, p. 30].

„...lichidul interstiţial are concentraţii înalte de ioni Na^+ şi Cl^- ; lichidul intracelular are concentraţii înalte de ioni K^+ şi conţine anioni organici necunoscuţi (A^-)" [2, p. 34].

„Din punct de vedere calitativ, distribuția ionilor Na^+ de o parte și de alta a membranei reprezintă o oglindire a distribuției ionilor K^+ : Na^+ scăzut în interior, K^+ scăzut în exterior... Na^+ crescut în exterior, K^+ crescut în interior" [2, 57].

„Transportul activ de Na^+ și K^+ menține concentrația intracelulară de Na^+ la valori scăzute și aceea de K^+ intracelular la valori ridicate" [2, p. 30].

„Pompa $Na^+ - K^+$ menține concentrația internă de Na^+ la o valoare scăzută" [2, p. 35].

„În ciuda acestei migrări, concentrația internă de Na^+ se menține la valori scăzute în celulele vii" [2, p. 35].

„Ionii K^+ tind să difuzeze în afara celulei, datorită concentrațiilor lor interne ridicate..." [2, p. 34].

Această *concluzie ipotetică* (1.1), bazată pe primele trei postulate ale teoriei membranei, este cîteodată prezentată ca un fapt experimental, ceea ce nu este just și induce în eroare pe unii cercetători. Spre exemplificare, citățm cîteva texte, subliniind pasajele corespunzătoare :

„...în acest capitol vor fi discutate două caracteristici evidente ale celulelor : *marea diferență între concentrațiile ionice* și marea diferență de potențial electric dintre interiorul celulei și lichidul interstițial. *Aceste două fapte* sînt cunoscute de multe decenii" [2, p. 31]. Or, este limpede că numai diferența de potențial electric este un fapt experimental, pe cînd „marea diferență între concentrațiile ionice" (concluzia 1.1) este doar o deducție ipotetică.

„Cei mai importanți factori care influențează mișcările ionilor au fost analizați în partea precedentă. Ar trebui acum... ca *diferențele de concentrație observate* de o parte și alta a membranei, precum și diferențele de voltaj ale celulelor să fie explicate numai prin acești factori". [2, p. 56]. Or, „diferențele de concentrație" reprezintă numai o concluzie ipotetică (concluzia 1.1) și nu rezultatul unei observații reale, a unui fapt experimental.

„Două proprietăți ale membranei celulare sînt în mare măsură răspunzătoare de *concentrația constantă* și de diferențele de potențial" [2, p. 30]. Or, concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în protoplasmă nu au fost constatate, ci numai deduse și admise pe baza postulatelor ipotetice 1.1, 1.2 și 1.3.

Concluzia 1.2. — Trecerea ionilor de sodiu și potasiu prin membrana electrică celulară, din lichidul interstițial (extracelular) în protoplasmă (lichid intracelular) și invers, se face ca între două soluții apoase separate printr-o membrană permeabilă pentru ambii ioni.

„...studiile cu ajutorul sodiului radioactiv au arătat că acești ioni pătrund prin membrană, deși nu atît de ușor ca ionii K^+ și Cl^- " [2, p. 50].

„Se crede însă că membrana este aproape impermeabilă pentru A^- și mult mai puțin permeabilă pentru Na^+ decît pentru K^+" [2, p. 35].

„Ionii difuzează prin membrană cu fracțiunea minimă a vitezei cu care ei difuzează prin apă... În majoritatea membranelor celulare, viteza de difuzie a Na^+ este mult mai redusă decît viteza de difuzie a K^+ și Cl^- " [2, p. 30].

„Membrana este aproximativ de 50 de ori mai permeabilă față de K^+ decît față de Na^+" [2, p. 57].

„Membrana este aproximativ de 100 de ori mai permeabilă față de K^+ decît față de Na^+" [2, p. 38].

Concluzia 1.3. — **Raportul dintre concentrațiile inegale ale ionilor de sodiu și potasiu în protoplasmă (lichid intracelular) și în lichidul interstițial (extracelular) corespunde unei stări de dezechilibru.**

„Na^+ este distribuit în așa fel, încît starea de echilibru este departe de a fi realizată — cu alte cuvinte $\Delta\mu_{Na}$ este atît de mare, încît se impune întrebarea : cum poate acest dezechilibru să fie menținut în celulele vii?" [2, p. 50].

„Distribuția de Na^+ în țesuturi este departe de a fi în echilibru... acest dezechilibru este menținut de către celulele vii ; $[Na^+]_i$ rămîne la o valoare scăzută și $\Delta\mu_{Na}$ rămîne crescut în ciuda unui influx considerabil de Na^+ ; ..." [2, p. 51].

„Postulatul că dezechilibrul de Na^+ dintre celule și mediul lichid înconjurător este menținut pe baza unui consum de energie metabolică constituie obiectul unui test experimental relativ simplu" [2, p. 52].

„Legătura dintre absorbția de K^+ și eliminarea de Na^+ explică ușorul dezechilibru existent în distribuția ionului K^+" [2, p. 35].

Cu toate că *această concluzie 1.3. este ipotetică*, deoarece se bazează pe concluziile ipotetice precedente și pe postulatele teoriei membranei, totuși și ea este prezentată adesea ca un *fapt experimental*. De exemplu :

„Pentru a reveni la cea de-a doua posibilitate menționată mai sus, și anume că un alt termen este necesar pentru echilibrarea influxului de Na^+, *există trei fapte* aparent contradictorii, cu privire la comportamentul Na^+ în țesuturi, care trebuie discutate : 1) Distribuția de Na^+ în țesuturi este departe de a fi în echilibru. 2) Ionii de Na pot trece prin membrana celulară. 3) Acest dezechilibru este menținut de către celulele vii". [2, p. 51]. Or, afirmația că „distribuția de Na^+ în țesuturi este departe de a fi în echilibru" se bazează pe concluziile ipotetice 1.1 și 1.3 și, prin urmare, este și ea o ipoteză. La fel se prezintă situația și în cazul afirmației că „acest dezechilibru este menținut de către celulele vii".

Concluzia 1.4. — **Distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasmă (lichid intracelular) și lichidul interstițial (extracelular) se realizează și se menține datorită capacității speciale a membranei electrice celulare de a transporta continuu și selectiv ionii de sodiu din protoplasmă în lichidul interstițial, iar ionii de potasiu în sens invers.**

Cu totul altfel se prezintă situația în cazul teoriilor sorbției și structurii.

Teoria sorbției

Teoria sorbției admite că protoplasma este un coacervat complex (postulatul 2.1) care ocupă întregul volum al celulei, că toată apa protoplasmei (apa coacervatului protoplasmatic) se prezintă sub formă de apă legată, cu însușiri de solvent mai slabe decît apa liberă obișnuită (postulatul 2.2) și că numai o parte a sodiului și potasiului din protoplasmă se află sub forma de ioni liberi, difuzibili, dizolvați în protoplasmă (apa legată a coacervatului protoplasmatic), restul fiind legat stabil de substratul proteic și adsorbit pe micelele coloidale ale coacervatului (postulatul 2.3). În aceste condiții, concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în apa proto-

plasmei (apa legată a coacervatului protoplasmatic) $[Na^+]_c$ și $[K^+]_c$ sînt reprezentate prin raporturile dintre cantitățile acestor ioni Na_i^+ și K_i^+ și cantitatea totală de apă A_i din protoplasmă :

$$[Na^+]_c = \frac{Na_i^+}{A_i}, \qquad [K^+]_c = \frac{K_i^+}{A_i}, \tag{IV}$$

în care cantitățile ionilor de sodiu și potasiu, Na_i^+ și K_i^+, sînt mai mici decît cantitățile totale de sodiu și potasiu Na_i și K_i aflate în protoplasmă (V) :

$$Na_i^+ < Na_i \qquad K_i^+ < K_i \tag{V}$$

c.1. — Concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în protoplasmă, adică în apa legată a coacervatului protoplasmatic, pot fi precizate pe baza postulatului 2.2. Conform acestui postulat, apa legată din protoplasmă se comportă ca un solvent mai slab decît apa liberă, obișnuită. Înseamnă că solubilitatea electroliților în apa legată a coacervatului protoplasmatic este mai mică decît în apa obișnuită și, prin urmare, concentrațiile atît ale ionilor de sodiu cît și acele ale ionilor de potasiu în această apă legată sînt mai mici decît în lichidul interstițial.

c.2. — Totodată, postulatul 2.2. precizează că apa legată a coacervatului protoplasmatic se comportă ca o fază aparte, nemiscibilă cu apa liberă obișnuită. Cum, în conformitate cu cel de-al II-lea fapt experimental, ionii de sodiu și de potasiu trec mai mult sau mai puțin ușor din protoplasmă în lichidul interstițial și invers, înseamnă că această trecere se face ca între două faze nemiscibile, aflate în contact.

c.3. — Se poate deci admite că raporturile dintre celule și lichidul interstițial sînt asemănătoare celor dintr-un sistem alcătuit din două faze lichide nemiscibile, în care se află substanțe solubile în ambele faze. Or, se știe că o substanță solubilă în două faze nemiscibile, aflate în contact, trece dintr-o fază în alta, pînă cînd între concentrațiile ei din cele două faze se stabilește echilibrul Henri. Deci, se poate admite că același echilibru Henri se stabilește și între concentrațiile atît ale ionilor de sodiu, cît și ale celor de potasiu, din sistemul protoplasmă-lichid interstițial.

c.4. — Prin urmare, concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în apa legată a coacervatului protoplasmatic, mai mici decît cele din lichidul interstițial, și realizate în cadrul echilibrului Henri, reprezintă unul din aspectele asimetriei distribuției acestor elemente între protoplasmă și mediu. Cum însă, conform I-ului fapt experimental, cantitatea de sodiu din unitatea de volum a protoplasmei este mai mică, iar cantitatea de potasiu este mai mare decît în unitatea de volum a lichidului interstițial, se mai admite că o bună parte a potasiului și numai o mică parte a sodiului din protoplasmă sînt legate stabil de proteinele coacervatului protoplasmatic și adsorbite reversibil pe micelele lui coloidale (postulatul 2.3).

Rezultă că, după teoria sorbției, distribuția asimetrică a electroliților între protoplasmă și lichidul interstițial, se datorește însușirii de sorbție a coacervatului protoplasmatic, adică atît legării și adsorbției inegale a potasiului și sodiului la nivelul proteinelor, respectiv al micelelor

coloidale ale coacervatului protoplasmatic, cît şi solubilităţii scăzute a electroliţilor acestor elemente în apa legată a acestui coacervat.

Se înţelege că distribuţia asimetrică a sodiului şi potasiului, astfel realizată, se menţine atîta timp cît se menţin însuşirile de sorbţie ale coacervatului protoplasmatic, adică în tot timpul vieţii celulelor (al III-lea fapt experimental).

Pe baza acestor consideratii, teoria sorbţiei ajunge la următoarele concluzii :

Concluzia 2.1. Concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu în apa protoplasmei (apa coacervatului protoplasmatic) sînt mai mici decît în lichidul interstiţial (extracelular), corespunzător solubilităţilor diferite ale electroliţilor în cele două medii nemiscibile.

$$[Na^+]_c < [Na^+]_e, \qquad [K^+]_c < [K^+]_e \tag{VI}$$

„În protoplasma vie, în stare de repaus, solubilitatea ionilor de clor şi sodiu este de 2—3 ori mai mică decît în apa înconjurătoare. Raportul dintre solubilitatea în protoplasmă şi solubilitatea în apa mediului înconjurător este de aproximativ 0,30—0,45" [1, p. 159].

„...în apa protoplasmei clorul este mai puţin solubil decît în mediu... Curba sodiului este paralelă cu curba clorului. Aceasta înseamnă că solubilitatea ambilor ioni în apa protoplasmei este aproximativ aceeaşi (K = 0,30)" [1, p. 161 şi 162]. Deci : sodiul se dizolvă în protoplasmă mai puţin decît în apa înconjurătoare.

„(K = 0,45). Cu alte cuvinte, solubilitatea potasiului în apa protoplasmei este cu 55% mai mică decît în lichidul extracelular" [1, p. 163].

„Solubilitatea ionilor în apa protoplasmei este mai mică decît în apa mediului înconjurător" [1, p. 166].

„...faţă de o serie de neelectroliţi, protoplasma se comportă ca un solvent mai rău decît apa înconjurătoare. Acelaşi lucru poate fi spus şi despre electroliţi" [1, p. 151].

În citatele de mai sus „notăm prin K coeficientul de repartiţie din ecuaţia Henri" [1, p. 128].

Concluzia 2.2. — Trecerea ionilor de sodiu şi potasiu din lichidul interstiţial (extracelular) în protoplasmă (apa coacervatului protoplasmatic) şi invers, se face ca între două faze nemiscibile, în care electroliţii au solubilităţi diferite.

Concluzia 2.3. — Raportul dintre concentraţiile inegale ale ionilor de sodiu, respectiv de potasiu, în apa protoplasmei (apa legată a coacervatului protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular) corespunde unei stări de echilibru Henri.

„Echilibrul care se stabileşte între concentraţia ionilor în apa celulei şi concentraţia lor în apa mediului este determinat de coeficientul de repartiţie K, totdeauna mai mic decît unu" [1, p. 166—167].

„...faţă de o serie de electroliţi, protoplasma se comportă ca un solvent mai rău decît apa înconjurătoare. Acelaşi lucru poate fi spus şi despre electroliţi. De aceea, acea parte a electroliţilor care este dizolvată în protoplasmă se află în echilibru cu soluţia înconjurătoare, mai concentrată, a aceloraşi electroliţi" [1, p. 151].

„...toate substanțele cercetate se dizolvă în ea (în protoplasmă) altfel decît în apă, solubilizarea fiind determinată de coeficientul de repartiție, diferit pentru diferite substanțe și totdeauna mai mic decît unu" [1, p. 167].

Concluzia 2.4. — Distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasmă (apa coacervatului protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular) se realizează și se menține datorită legării unei părți a potasiului — și chiar a sodiului — din protoplasmă de către proteinele coacervatului protoplasmatic, adsorbției sodiului și potasiului pe micelele coloidale ale coacervatului protoplasmatic și solubilității mai mici a electroliților cu sodiu și potasiu în apa legată a coacervatului protoplasmatic decît în lichidul interstițial.

„Prezența în celulele aflate în stare de repaus a unor cantități crescute de potasiu și fosfați, în comparație cu mediul, se explică prin aceea că o parte însemnată a acestora este legată de proteine" [1, p. 158].

„...protoplasma vie reprezintă un sistem coacervatic care se comportă ca o fază insolubilă în apă, în care majoritatea electroliților este legată, iar electroliții dizolvați se află în altă concentrație decît în soluția înconjurătoare" [1, p. 339].

Teoria structurii

Teoria structurii admite că protoplasma este un ansamblu alcătuit din două feluri de materie : vie și nevie (postulatul 3.1), fiecare ocupînd cîte o parte din volumul celular ; că numai apa de imbibiție a materiei vii și apa liberă a materiei nevii au însușiri de solvent, apa integrată în structura materiei vii neavînd această însușire (postulatul 3.2), și că numai o parte a sodiului și potasiului din protoplasmă este dizolvată sub formă de ioni difuzibili atît în apa de imbibiție a materiei vii, cît și în apa liberă a materiei nevii, restul acestor elemente fiind integrat în structura materiei vii și adsorbit la nivelul materiei vii și pe coloizii aflați în materia nevie (postulatul 3.3.).

În aceste condiții, cantitatea ionilor liberi de sodiu și potasiu (Na_i^+ și K_i^+) din protoplasmă, constă din suma ionilor aflați în apa de imbibiție a materiei vii (Na_b^+ și K_b^+) și în apa liberă a materiei nevii (Na_n^+ și K_n^+), conform egalităților :

$$Na_i^+ = Na_b^+ + Na_n^+, \quad K_i = K_b^+ + K_n^+ \tag{VII}$$

și este mai mică decît cantitatea totală de sodiu și potasiu Na_i și K_i aflată în protoplasmă :

$$Na_i^+ < Na_i \qquad K_i^+ < K_i \tag{VIII}$$

Concentrațiile corespunzătoare pot fi exprimate prin formulele :

$$[Na^+]_b = \frac{Na_b^+}{A_b}, \quad [K^+]_b = \frac{K_b^+}{A_b} \qquad \text{și } [Na^+]_n = \frac{Na_n^+}{A_n}, \quad [K^+]_n = \frac{K_n^+}{A_n} \tag{IX}$$

în care A_b şi A_n reprezintă apa de imbibiţie a materiei vii, respectiv apa liberă a materiei nevii a protoplasmei.

Totodată, este de remarcat că, dacă se notează cu A_s apa integrată în structura materiei vii, adică apa care nu are însuşirea de solvent, atunci apa totală A_t cuprinsă în protoplasmă poate fi exprimată prin formula :

$$A_t = A_s + A_b + A_n \qquad (X)$$

iar apa A_v cuprinsă în materia vie a protoplasmei poate fi exprimată prin formula :

$$A_v = A_s + A_b \qquad (XI)$$

Se înţelege că valorile Na_b^+ , K_b^+ , Na_n^+ şi K_n^+ , care reprezintă cantităţile ionilor respectivi aflaţi în celulă, depind nu numai de concentraţiile lor în fracţiunile corespunzătoare de apă în care sînt dizolvaţi, dar şi de cantităţile acestor fracţiuni de apă ; aceste valori sînt cu atît mai mici cu cît cei doi parametri, luaţi aici în consideraţie sînt şi ei mai mici.

Un interes deosebit prezintă cazul cînd protoplasma nu conţine deloc apă liberă, sau o conţine în cantitate prea mică faţă de cantitatea apei de imbibiţie a materiei vii. Atunci se poate admite că totalitatea substanţelor materiei nevii a protoplasmei se află sub formă de soluţie în apa de imbibiţie a materiei ei vii iar, cum într-un asemenea caz, valorile Na_n^+, K_n^+ şi A_n sînt neglijabile faţă de Na_b^+, K_b^+ şi A_b, egalităţile (VII) devin :

$$Na_i^+ = Na_b^+ \text{ şi } K_i^+ = K_b^+ \qquad (XII)$$

iar formulele IX pot fi prezentate sub forma :

$$[Na^+]_b = \frac{Na_i^+}{A_b}, \qquad [K^+]_b = \frac{K_i^+}{A_b} \qquad (XIII)$$

c.1. — Astfel, spre deosebire de teoriile membranei şi sorbţiei, care admit numai cîte o singură formaţie protoplasmatică ce conţine ioni, lichidul intracelular, respectiv apa legată a coacervatului protoplasmatic, teoria structurii distinge în protoplasmă două asemenea formaţii, în care concentraţiile ionilor de bună seamă sînt diferite : apa liberă a materiei nevii şi apa de imbibiţie a materiei vii (postulatul 3.2.).

Unele precizări cu privire la aceste concentraţii pot fi aduse pe baza celui de-al II-lea fapt experimental, după care ionii de sodiu şi potasiu trec mai mult sau mai puţin uşor din protoplasmă în lichidul interstiţial, şi invers. Faptul acesta arată că atît membranele care se formează la suprafaţa protoplasmei, cît şi materia vie însăşi, sînt permeabile pentru ionii menţionaţi, permiţînd trecerea şi repartizarea lor conform solubilităţii electroliţilor respectivi.

Din moment ce admitem că apa materiei nevii se comportă ca apă liberă, obişnuită (postulatul 3.2), înseamnă că solubilitatea electroliţilor în ea este aceeaşi ca şi în apa lichidului interstiţial, ceea ce face ca în ambele lichide concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu să fie aceleaşi.

Altfel se prezintă situația în legătură cu apa de imbibiție a materiei vii. Pînă la stabilirea stării și însușirilor ei prin cercetări experimentale, admitem provizoriu — pe baza postulatului 3.2 — că ea, ca și apa legată a coloizilor, se comportă față de apa obișnuită ca o fază aparte, în care solubilitatea electroliților și, prin urmare, concentrația ionilor de sodiu și potasiu sînt altele decît în apa liberă a materiei nevii și a lichidului interstițial. Nu este însă exclus ca apa de imbibiție a materiei vii să se găsească în altă stare și să prezinte alte însușiri decît apa legată a coloizilor, deoarece materia vie se deosebește profund ca structură, stare și însușiri de orice sistem coloidal neviu, ceea ce poate condiționa altfel de relații între această materie și apa care o imbibă.

c.2. — Din considerațiile de mai sus rezultă că schimburile ionilor de sodiu și potasiu între lichidul interstițial și apa liberă a materiei nevii se fac ca între două soluții apoase separate printr-o membrană permeabilă, pe cînd acelea între lichidul interstițial și apa de imbibiție a materiei vii, respectiv între aceasta și apa liberă a materiei nevii, se fac ca între două faze nemiscibile în care electroliții au solubilități diferite.

c.3. — Dată fiind trecerea relativ ușoară, în ambele sensuri, a ionilor de sodiu și potasiu dintre protoplasmă și lichidul interstițial (al II-lea fapt experimental), se poate admite că între concentrațiile acestor ioni în apa liberă a materiei nevii și în lichidul interstițial se realizează, în general, echilibrul de difuzie, pe cînd între concentrațiile din apa de imbibiție a materiei vii și celelalte două lichide (lichidul interstițial și apa liberă a materiei nevii) se realizează un echilibru special, pe care — provizoriu — îl vom denumi „echilibru complex" *. Totuși, în funcție de împrejurări, se pot stabili și alte echilibre. Așa de exemplu, este deajuns ca membranele celulare, ale căror compoziție, structură și însușiri depind de metabolism [11], să devină impermeabile pentru coloizi, iar materia nevie a protoplasmei să se încarce cu proteine, pentru ca între concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu din lichidul interstițial și apa liberă a materiei nevii, să intervină nu echilibrul de difuzie, ci echilibrul Donnan.

c.4. — Diferențele de concentrații ale ionilor de sodiu și potasiu care se realizează între protoplasmă și lichidul interstițial (extracelular) în cadrul anumitor echilibre (Henri, Donnan) contribuie, desigur, la asimetria distribuției electroliților între mediile intra- și extracelular. Mai contribuie la aceasta și fenomenele de adsorbție diferită a ionilor de sodiu și potasiu la nivelul materiei vii și al coloizilor aflați în materia nevie, semnalate în postulatul 3.3. Dar, nici unele și nici celelalte nu pot acoperi acele deosebiri mari dintre cantitățile de sodiu și potasiu aflate în protoplasmă și în lichidul interstițial, care sînt puse în evidență de I-ul fapt experimental. De aceea, dar și din alte motive, care vor fi prezentate mai jos, admitem că o bună parte a potasiului, și poate o mică parte a sodiului sînt integrate în structura materiei vii ca componente ale acesteia, condiționînd astfel distribuția lor asimetrică.

Rezultă că, după teoria structurii, distribuția asimetrică a sodiului și potasiului dintre protoplasmă și lichidul interstițial se datorește parti-

* Natura acestui „echilibru complex" va forma obiectul unei alte lucrări.

cipării potasiului (sodiului) la alcătuirea structurii materii vii. În același sens mai contribuie și adsorbția diferită a ionilor acestor elemente la nivelul materiei vii și al coloizilor aflați în materia nevie a protoplasmei, precum și diferențele de concentrație a electroliților respectivi în mediile intra- și extracelular.

Se înțelege că distribuția asimetrică a sodiului și potasiului, astfel realizată se menține atîta timp cît se menține integritatea structurii materiei vii a protoplasmei, adică în tot timpul vieții celulelor (al III-lea fapt experimental).

Din considerațiile de mai sus se desprind următoarele concluzii ale teoriei structurii :

Concluzia 3.1. — Concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în apa liberă a materiei nevii din protoplasmă sînt principial egale cu acelea din lichidul interstițial (extracelular), iar cele din apa de imbibiție a materiei vii diferă de acelea din lichidul interstițial și din apa liberă a materiei nevii, corespunzător solubilităților diferite ale electroliților în mediile respective :

$$\begin{array}{ll} [Na^+]_n = [Na^+]_e & [K^+]_n = [K^+]_e \\ [Na^+]_b \neq [Na^+]_e & [K^+]_b \neq [K^+]_e \\ [Na^+]_b \neq [Na^+]_n & [K^+]_b \neq [K^+]_n \end{array} \qquad \text{(XIV)}$$

Concluzia 3.2. — Trecerea ionilor de sodiu și potasiu din lichidul interstițial (extracelular) în apa liberă a materiei nevii din protoplasmă și invers, se face ca între două soluții apoase separate prin membrană permeabilă, materia vie fiind și ea permeabilă pentru acești ioni. În schimb, trecerea acelorași ioni din lichidul interstițial și din apa liberă a materiei nevii în apa de imbibiție a materiei vii și invers se face ca între două faze nemiscibile, în care electroliții au solubilități diferite.

Concluzia 3.3. — Raportul dintre concentrațiile egale ale ionilor de sodiu, respectiv potasiu, din apa liberă a materiei nevii din protoplasmă și lichidul interstițial, corespunde unei stări de echilibru de difuzie ; el poate să corespundă însă și altor echilibre, ca de exemplu echilibrului Donnan, cînd datorită impermeabilizării membranelor celulare pentru coloizi și încărcării materiei nevii cu proteine, concentrațiile ionilor menționați devin inegale. În același timp, raportul dintre concentrațiile inegale ale acelorași ioni în apa de imbibiție a materiei vii și lichidul interstițial, respectiv apa liberă a materiei nevii, corespunde unei stări de „echilibru complex".

Concluzia 3.4. — Distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasmă (ansamblu protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular) se realizează și se menține datorită : includerii majorității potasiului a unei cantități mici de sodiu celular în structura materiei vii, ca componente ale acesteia, adsorbției sodiului și potasiului la nivelul materiei vii și al coloizilor aflați în materia nevie a protoplasmei și altei solubilități a electroliților cu sodiu și potasiu în apa de imbibiție a materiei

vii din protoplasmă, decît în apa liberă atît a materiei nevii cît și a lichidului interstițial. Pot însă interveni și alți factori, ca de exemplu cei care provoacă scăderea concentrațiilor ionilor de sodiu și potasiu în apa liberă a materiei nevii și contribuie astfel la stabilirea echilibrului Donnan etc.

2. MEMBRANELE CELULARE ȘI REPARTIȚIA IONILOR DE SODIU ȘI POTASIU ÎNTRE PROTOPLASMĂ ȘI LICHIDUL INTERSTIȚIAL

După prezentarea primelor concluzii ale teoriilor membranei, sorbției și structurii cu privire la distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial, urmează să precizăm atitudinea acestor trei teorii față de problema membranelor celulare. Comparația postulatelor 1.4, 2.4 și 3.4 arată că numai teoria membranei acordă acestei formațiuni celulare o importanță cu totul deosebită. De aceea, vom examina mai întîi punctul de vedere al teoriei membranei relativ la noțiunea, structura și rolul membranelor celulare, urmînd să examinăm apoi punctele de vedere ale celorlalte două teorii. În felul acesta vor putea fi conturate concluziile tuturor acestor teorii cu privire la :

c.5 — rolul membranelor celulare în repartiția ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă și lichidul interstițial.

Teoria membranei

După cum s-a arătat, teoria membranei se bazează pe ipoteza că membrana electrică celulară este factorul principal în condiționarea asimetriei distribuției electroliților între protoplasmă și lichidul interstițial (postulatul 1.4) și că distribuția asimetrică a sodiului și potasiului se realizează datorită capacității speciale a membranei electrice celulare de a transporta continuu și selectiv ionii de sodiu din protoplasmă în lichidul interstițial, iar ionii de potasiu în sens invers (concluzia 1.4). Aducerea altor precizări cu privire la rolul membranei electrice celulare în condiționarea acestei distribuții necesită însă cunoașterea modului cum se concepe în teoria amintită atît natura cît și structura acestei membrane.

Prin membrană, se înțelege „limita dintre lichidul intracelular și cel interstițial... considerată ca fiind un strat neapos subțire (100 Ångstromi), căruia i s-a dat denumirea de membrană electrică, deoarece natura sa a fost stabilită mai ales în urma unor măsurători electrice" [2, p. 30].

Structura acestei membrane se concepe în modul următor : „membrana electrică a celulei constă, probabil, din cîteva straturi alternative de lipide și proteine. În stratul de lipide, moleculele lungi și subțiri sînt așezate foarte strîns, unele lîngă altele, cu axele lor lungi dispuse paralel și orientate perpendicular față de membrană. Stratul de lipide este bimolecular ; terminațiile nepolare ale moleculelor de lipide sînt opuse. Structura membranei constă, probabil, dintr-un strat bimolecular de lipide, prins între două straturi monomoleculare de proteine. Straturile de proteine

sînt legate de lipide la extremităţile lor polare. Membrana este alcătuită, probabil, dintr-o unitate (85 Ångstromi) sau două unităţi (170 Ångstromi) de straturi lipoproteinice. Lipidele sînt hidrofobe şi pare puţin probabil ca apa sau substanţele solubile în apă să pătrundă prin membrane într-o regiune unde stratul de lipide este compact" [2, p. 38].

c.5. — Pentru explicarea permeabilităţii unei astfel de membrane faţă de ioni şi diferite substanţe aposolubile (concluzia 1.2), se presupune că membrana electrică celulară conţine pori umpluţi cu apă, care permit trecerea ionilor şi diferitelor substanţe aposolubile din licnidul protoplasmatic în lichidul interstiţial şi invers.

„Membrana este perforată, conţinînd pori umpluţi cu apă, care au un diametru mic (aproximativ 3 Ångstromi). Ionii ar putea difuza destul de rapid prin aceşti pori. Limitarea fluxurilor este pusă pe seama numărului relativ redus de pori pe unitatea de suprafaţă de membrană şi a efectelor restrictive ale porilor. Membrana este aproximativ de 100 de ori mai permeabilă faţă de K^+ decît faţă de Na^+. Această diferenţă reprezintă unul din motivele pe baza căruia se presupune că diametrul porilor este de 3 Ångstromi, cifră intermediară între diametrele hidratate ale K^+ (2,2 Ångstromi) şi Na^+ (3,4 Ångstromi)" [2, p. 38, 39].

„Porii din membrană sînt consideraţi suficient de mari pentru a permite trecerea cu uşurinţă a ionilor K^+ şi Cl^-, dar suficient de mici pentru ca ionii de Na^+ ceva mai mari să nu poată trece decît cu multă dificultate" [2, p. 39].

Dar, un astfel de mecanism de trecere „pasivă" a ionilor prin porii membranei poate duce cel mult la echilibrarea concentraţiilor electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial în cazul cînd, din anumite motive, aceste concentraţii ar fi inegale. Or, identificînd distribuţia asimetrică a sodiului şi potasiului între mediile intra- şi extracelular (1-ul fapt experimental) cu repartiţia asimetrică a concentraţiilor ionilor acestor elemente de o parte şi de alta a membranei electrice celulare (concluzia 1.1), teoria membranei admite atît existenţa ipotetică a unui dezechilibru permanent între aceste concentraţii (concluzia 1.3), cît şi capacitatea ipotetică a membranei electrice celulare de a transporta continuu, selectiv şi în sensuri opuse ionii de sodiu şi pe cei de potasiu (concluzia 1.4). Un astfel de transport selectiv de ioni poate fi conceput numai presupunînd existenţa, în însăşi membrana electrică celulară, a unui mecanism special, capabil să asigure trecerea „forţată" (transportul activ, „pomparea" selectivă) a ionilor prin această membrană. Dat fiind că, în conformitate cu concluzia 1.1, concentraţia ionilor de sodiu în lichidul interstiţial este mult mai mare decît în lichidul intracelular, se deduce că mecanismul acesta îndepărtează continuu din protoplasmă ionii de sodiu care pătrund necontenit în celulă prin porii membranei, datorită concentraţiei lor mari în lichidul interstiţial. Totodată se admite că, pe măsura „pompării" ionilor de sodiu din interiorul celulei spre exterior, mecanismul respectiv „pompează" în sens invers ionii de potasiu, asigurîndu-se astfel menţinerea diferenţelor mari dintre concentraţiile ionilor menţionaţi în protoplasmă şi în lichidul interstiţial. Mecanismul acesta care, conform teoriei membranei, asigură transportul activ al ionilor prin membrana electrică celulară, a fost numit „pompa ionilor de sodiu şi potasiu" sau pe scurt „pompa de sodiu".

„Se știe că eliminarea unui ion Na^+ este de obicei însoțită de preluarea de către celulă a unui ion K^+. Acest proces este descori menționat ca fiind un transport activ de Na^+, o pompă de $Na^+ - K^+$ sau, mai simplu, o pompă de Na^+. Cuvîntul „pompă" denotă că este nevoie de energie metabolică. „Transport activ" este un alt termen utilizat pentru acest proces" [2, p. 35].

„Deoarece Na^+ intră în celule în mod spontan, trebuie efectuat un lucru mecanic pentru transportul ionilor de Na^+ afară din celulă. Mai mult decît atît. Na^+ pătrunde în celulă tot timpul, astfel încît lucrul mecanic trebuie efectuat continuu, pentru a împiedica intrarea ionilor de Na^+ și a menține un $[Na^+]_i$ scăzut... Procesul prin care celula utilizează continuu energie metabolică pentru a menține un eflux de Na^+ este numit transport activ de Na^+ sau, în limbaj curent, „pompa de Na^+" [2, p. 51].

Din cele de mai sus se ajunge la :

Concluzia 1.5. — Membrana electrică celulară cuprinde în structura ei un anumit mecanism, numit „pompa de sodiu", care asigură transportul activ, selectiv și în sensuri opuse al ionilor de sodiu și potasiu între protoplasma (lichidul intracelular) și lichidul interstițial (extracelular), intervenind astfel activ în repartiția concentrațiilor acestor ioni între mediile intra- și intercelular.

„În afară de aceasta, prin metoda atomilor marcați se poate arăta că potasiul, sodiul și clorul pot pătrunde destul de repede în celule și ieși din ele, menținîndu-se diferențele de concentrații înăuntrul și în afara celulelor. Teoria membranei, în forma ei inițială, nu putea explica aceasta. A devenit necesar să se admită existența unui mecanism care, consumînd energie, ar pompa potasiul spre interiorul celulei, iar sodiul și clorul spre exterior" [1, p. 108].

„Una dintre încercările de acest gen este renunțarea la concepția semipermeabilității pasive a membranei bazată pe principiul „sitei" sau solubilității selective a substanțelor în membrane (solubilitatea în lipoizi) și înlocuirea ei prin ipoteza despre anumite mecanisme capabile — cu participarea metabolismului — să pompeze selectiv din celule sau să transporte în celule substanțe din mediul înconjurător. De aici face parte... teoria transportului activ al moleculelor de zaharuri prin membrane cu ajutorul enzimelor speciale și al transportorilor localizați în membrana celulară (Rosenberg, Wilbrand și alții). Tot aici se încadrează și teoria emisă de Lundegard și Crog, după care membrana constă din molecule sub formă de bastonașe, aranjate ca o palisadă și capabile să cuprindă cu vîrfurile lor ionii de sodiu sau potasiu și, întorcîndu-se cu 180°, să transporte acești ioni după necesitate, fie în celulă, fie din ea în mediul înconjurător. În fine, tot aici se încadrează teoria „pompei de sodiu" a lui Hodgkin, și altele" [1, p. 173].

„Există o moleculă specială lipido-solubilă transportoare (și care probabil este o fosfatidă), limitată la membrană, care se combină cu precădere cu anumiți ioni. Un ion din lichidul interstițial se poate combina cu această moleculă transportoare la suprafața exterioară a membranei; complexul transportor de ioni ar putea difuza prin membrană pe suprafața interioară. Ionul s-ar putea apoi disocia de molecula transportoare, intrînd în lichidul intracelular" [2, p. 39].

„Unii cercetători, pentru a explica asimetria compoziției ionice a protoplasmei... propun o ipoteză nouă, după care în membrana celulară ar exista un mecanism care pompează neîntrerupt din celule ionii de sodiu și-i scoate afară, ceea ce face ca concentrația lor în interiorul protoplasmei să fie în orice moment mai scăzută decît în exterior" [1, p. 150].

„Transportul activ de Na^+ și K^+ menține concentrația intracelulară de Na^+ la valori scăzute și pe aceea de K^+ intracelular la valori ridicate" [2, p. 30].

„Adepţii teoriei pompei, spre deosebire de adepţii teoriei sorbţiei, rămîn fideli ideii unei pelicule superficiale şi în consideraţiile lor ipotetice caută să localizeze presupusa „pompă" în interiorul membranei" [1, p. 176].

Cu totul altfel este privită problema membranelor celulare de către teoriile sorbţiei şi structurii.

Teoria sorbţiei

Teoria sorbţiei se bazează pe ipoteza că factorul principal care condiţionează asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă (coacervatul protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular) este sorbţia coacervatului protoplasmatic (postulatul 2.4), şi că distribuţia asimetrică a sodiului şi potasiului se realizează prin legarea unei părţi a potasiului şi sodiului celular de către proteinele coacervatului, prin adsorbţia reversibilă a sodiului şi potasiului pe micelele lui coloidale şi prin solubilitatea mai mică a electroliţilor în apa legată a coacervatului protoplasmatic decît în lichidul interstiţial (concluzia 2.4).

c.5. — Astfel teoria sorbţiei admite că trecerea ionilor de sodiu şi potasiu din lichidul interstiţial în apa legată a coacervatului protoplasmic şi invers, se realizează ca între două faze lichide nemiscibile (concluzia 2.2), iar raportul dintre concentraţiile acestor ioni în cele două medii (apa legată a coacervatului protoplasmatic şi lichidul interstiţial, extracelular) corespunde unei stări de echilibru Henri (concluzia 2.5). De aici :

Concluzia 2.5. — Membranele celulare nu intervin activ şi nu au vreun rol special în repartiţia ionilor de sodiu şi potasiu între protoplasmă (apa legată a coacervatului protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular).

„Mecanismele care reglează repartiţia substanţelor între celulă şi mediu sînt localizate în întreaga masă a protoplasmei vii şi nu sînt în mod obligatoriu legate de suprafaţa ei. De aceea, teoria sorbţiei nu recurge la ipoteza membranelor celulare superficiale. Astfel de pelicule pot să existe, la fel ca şi alte formaţiuni de suprafaţă (învelişuri cuticulare, membrane ciliate, membrane ovulate ş.a.), însă ele îndeplinesc unele sau altele dintre funcţiile celulare parţiale şi nu joacă acel rol universal în fenomenele de distribuţie a substanţelor între celulă şi mediu, care este atribuit de obicei membranelor celulare" [1, p. 176].

Teoria structurii

Teoria structurii se bazează pe ipoteza că factorul principal care condiţionează asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă (ansamblul protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular) este structura materiei vii (postulatul 3.4) şi că distribuţia asimetrică a sodiului şi potasiului se realizează prin integrarea unei părţi a potasiului celular (poate şi a unei părţi mici de sodiu), în structura materiei vii, prin adsorbţia sodiului şi potasiului la nivelul materiei vii şi pe coloizi aflaţi în materia nevie a protoplasmei, ca şi prin solubilitatea diferită a electroliţilor cu sodiu şi potasiu în apa de imbibiţie a materiei vii din protoplasmă (concluzia 3.4).

c.5. — Totodată, teoria structurii admite că trecerea ionilor de sodiu și potasiu din lichidul interstițial în apa liberă a materiei nevii din protoplasmă se face ca între două soluții apoase separate prin membrana permeabilă, materia vie fiind și ea permeabilă pentru acești ioni (concluzia 3.2) și că raporturile dintre concentrațiile atît ale ionilor de sodiu în apa de imbibiție (a materiei vii) și apa liberă (a materiei nevii și a lichidului interstițial) cît și ale concentrațiilor ionilor de potasiu în soluțiile respective corespund în general unor stări de echilibru (concluzia 3.3). Membranele însă sînt privite ca formațiuni în continuă evoluție și transformare, dependentă de metabolism [11], ceea ce face ca în anumite împrejurări aceste membrane să poată modifica natura unora dintre echilibrele menționate; de exemplu ele pot determina apariția echilibrului Donnan, atunci cînd devin impermeabile pentru coloizi. De aici:

Concluzia *3.5.* Membranele celulare nu intervin activ în repartiția ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă (apa liberă a materiei nevii și apa de imbibiție a materiei vii) și lichidul interstițial (extracelular), dar pot influența această repartiție pe măsura schimbării însușirilor lor în funcție de desfășurarea metabolismului.

3. ENERGIA PROVENITĂ DIN METABOLISM ȘI DISTRIBUȚIA ASIMETRICĂ A SODIULUI ȘI POTASIULUI ÎNTRE PROTOPLASMĂ ȘI LICHIDUL INTERSTIȚIAL

În legătură cu relațiile dintre metabolismul celular și distribuția asimetrică a electroliților dintre protoplasmă și lichidul interstițial, vom lua în considerație un singur fapt experimental bine cunoscut, și anume:

Al IV-lea fapt experimental

Asimetria distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial (extracelular) este influențată de metabolismul celular: scăderea intensității metabolismului sub acțiunea inhibitorilor specifici (dinitrofenol, cianuri, temperatura scoborîtă etc.) este însoțită de micșorarea acestei asimetrii.

„Otrăvirea celulelor prin inhibitorii metabolici micșorează diferența dintre concentrațiile substanțelor din afara și dinăuntrul celulelor" [1, p. 177].

Fiecare teorie dă acestui fapt experimental o altă interpretare, ajungînd la concluzii diferite cu privire la:

c.6. — rolul energiei provenite din metabolism în distribuția sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial.

c.7. — repercusiunea inhibării metabolismului asupra asimetriei distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial.

Teoria membranei

c.6. — Teoria membranei admite că concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu din protoplasmă diferă mult de cele din lichidul interstiţial (concluzia 1.1) şi că această repartiţie asimetrică a ionilor menţionaţi corespunde unei stări de dezechilibru (concluzia 1.3). Dar menţinerea unei stări de dezechilibru în repartiţia unor componente între două soluţii apoase separate printr-o membrană permeabilă pentru componentele respective, necesită un consum de energie. Cum, cel de al IV-lea fapt experimental arată că distribuţia sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial este influenţată de intensitatea metabolismului, înseamnă că activitatea acelor factori care condiţionează asimetria distribuţiei menţionate depinde de energia provenită din metabolism şi variază în funcţie de aportul acesteia. Or, după teoria membranei factorul principal care determină asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial este membrana electrică celulară (postulatul 1.4) cu pompa ei de sodiu (concluzia 1.5). De aici :

Concluzia 1.6. — Energia provenită din metabolism pune şi menţine în funcţie „pompa de sodiu" localizată în membrana electrică celulară, care transportînd activ şi permanent în sensuri opuse ionii de sodiu şi de potasiu între celulă şi mediu, asigură repartiţia inegală a acestor ioni între protoplasmă (lichidul intracelular) şi lichidul interstiţial (extracelular).

„Energia care rezultă din metabolism este utilizată de celule pentru a transporta Na^+ în afara celulei şi K^+ în interiorul celulei" [2, p. 30].

„Deoarece trebuie efectuată o activitate pentru transportarea ionului Na^+ dintr-o regiune cu concentraţie scăzută în altă regiune cu o concentraţie ridicată, şi de la un potenţial electric mai scăzut la un altul mai ridicat, se trage concluzia că energia derivată din metabolismul celular este utilizată pentru transportarea ionului Na^+ în afara celulei" [2, p. 35].

„Se înţelege că activitatea unei astfel de ipotetice „pompe de sodiu", cum o numeşte Hodgkin, necesită o continuă cheltuială de energie pe socoteala metabolismului intracelular" [1, p. 150].

„Din punctul de vedere al teoriei „pompei celulare", pomparea neîntreruptă a unei substanţe din celulă sau în celulă necesită o cheltuială continuă de energie, provenită din metabolism" [1, p. 177].

„Cuvîntul pompă denotă că e nevoie de energie metabolică" [2, p. 35].

c.7. — Bazată pe această concluzie (1.6), teoria membranei admite că metabolismul scăzut furnizează mai puţin din energia necesară menţinerii activităţii normale a pompei de sodiu. De aici :

Concluzia 1.7. — Inhibarea metabolismului duce la scăderea activităţii pompei de sodiu din membrana electrică celulară şi, prin aceasta, la modificarea raporturilor dintre electroliţii intra- şi intercelulari, în sensul micşorării asimetriei distribuţiei sodiului şi potasiului între protoplasmă (lichid intracelular) şi lichidul interstiţial (extracelular).

Dar, se recunoaște că cunoștințele noastre în acest domeniu sînt încă insuficiente.

„...mecanismul de utilizare a energiei metabolice pentru transportarea ionilor de Na^+ afară din celulă nu este încă cunoscut în amănunt..." [2, p. 53].

„Se cunosc puține date cu privire la felul cum energia metabolică este folosită pentru a scoate ionul Na^+ afară din celulă" [2, p. 35].

Teoria sorbției

c.6. — Această teorie admite că concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în protoplasmă (apa legată a coacervatului protoplasmatic) sînt mai mici decît în lichidul interstițial (concluzia 2.1) și că această repartiție asimetrică a concentrațiilor ionilor menționați este condiționată de solubilitatea mai scăzută a electroliților respectivi în apa legată a coacervatului protoplasmatic decît în apa liberă a lichidului interstițial și corespunde unei stări de echilibru Henri (concluzia 2.3). Dar, menținerea unei stări de echilibru în repartiția unei componente între două faze lichide nemiscibile aflate în contact (a se vedea concluzia 2.2), nu necesită un consum de energie. Cum însă, cel de al IV-lea fapt experimental arată că distribuția sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial este influențată de metabolism, înseamnă că activitatea acelor factori care condiționează asimetria acestei distribuții depinde de energia provenită din metabolism și variază în funcție de aportul acestuia. Or, după teoria sorbției, factorul principal care determină asimetria distribuției electroliților între protoplasmă și lichidul interstițial este sorbția coacervatului protoplasmatic (postulatul 2.4). De aici :

Concluzia 2.6. — Energia provenită din metabolism menține însușirile de sorbție ale coacervatului protoplasmatic, dependente de structura sa fizico-chimică, însușiri care asigură asimetria distribuției electroliților între protoplasmă (coacervat protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular).

„După structura sa fizico-chimică, protoplasma vie este un coacervat complex în care repartiția substanțelor între celule și mediu este determinată în primul rînd de această structură" [1, p. 172].

„Noi știm că și în stare de repaus, în celulă are loc așa zisul metabolism bazal ; rostul lui este de a menține acea extrem de labilă structură a protoplasmei de care depind toate însușirile ei... În felul acesta, teoria sorbției afirmă că distribuția existentă a substanțelor între celula vie și mediu poate să apară și să se mențină numai cu condiția unui consum de energie pe socoteala metabolismului" [1, p. 177].

c.7. — Bazată pe această concluzie (2.6), teoria sorbției admite că metabolismul scăzut furnizează mai puțin din energia necesară menținerii însușirilor de sorbție ale coacervatului protoplasmatic. De aici :

Concluzia 2.7. Înhibarea metabolismului duce la estomparea însușirilor de sorbție ale protoplasmei (coacervatului protoplasmatic) și,

prin aceasta, la o redistribuire a electroliţilor intra şi extracelulari în sensul micşorării asimetriei distribuţiei sodiului şi potasiului între protoplasmă (coacervatul protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular).

„Orice modificare a metabolismului bazal trebuie să ducă la modificarea însuşirilor de sorbţie ale protoplasmei, a capacităţii sale de a dizolva diferitele substanţe etc. (Nasonov şi Alexandrov). Prin urmare, din punctul de vedere al teoriei sorbţiei, orice modificări ale metabolismului trebuie să determine o redistribuire a substanţelor" [1, p. 177].

Teoria structurii

c.6. — Această teorie admite că în protoplasmă există două medii deosebite, care conţin ionii de sodiu şi potasiu în concentraţii diferite : apa liberă a materiei nevii, în care concentraţiile ionilor menţionaţi sînt principial aceleaşi ca şi în lichidul interstiţial, şi apa de imbibiţie a materiei vii, în care concentraţiile acestor ioni diferă de acelea din lichidul interstiţial şi din apa liberă a materiei nevii (concluzia 3.1). Această repartiţie a concentraţiilor ionilor de sodiu şi potasiu corespunde unor stări de echilibru, şi anume : între concentraţiile lor în apa liberă a materiei nevii şi lichidul interstiţial se realizează, principial, echilibrul de difuzie, iar între concentraţiile lor în apa de imbibiţie a materiei vii şi lichidul interstiţial, respectiv apa liberă a materiei nevii, se realizează un „echilibru complex" (concluzia 3.3). Dar, menţinerea unei stări de echilibru în repartiţia unor componente, atît între două soluţii apoase separate printr-o membrană permeabilă (cazul apei libere a materiei nevii şi lichidului interstiţial), cît şi între două faze nemiscibile aflate în contact (cazul apei de imbibiţie a materiei vii şi al lichidului interstiţial, respectiv al apei libere a materiei nevii, a se vedea postulatul 3.2), nu necesită un consum de energie. Cum însă, cel de al IV-lea fapt experimental arată că distribuţia sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial este influenţată de metabolism, înseamnă că activitatea acelor factori care condiţionează asimetria acestei distribuţii depinde de energia provenită din metabolism şi variază în funcţie de aportul acesteia. Or, după teoria structurii, factorul principal care determină asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial este structura materiei vii (postulatul 3.4). De aici :

Concluzia 3.6. — Energia provenită din metabolism menţine structura materiei vii în care este integrată o bună parte a potasiului celular, precum şi o mică parte a sodiului, ceea ce asigură asimetria distribuţiei ctroliţilor respectivi între protoplasmă şi lichidul interstiţial (extracelular).

„existenţa unei molecule în materia nevie nu necesită un aport continuu de energie. Existenţa unei componente în materia vie necesită un aport continuu de energie" [10, p. 9].

„Se înţelege că fenomenul deformării şi menţinerea unei componente în stare deformată necesită un aport de energie şi de aceea problema raporturilor energetice atît dintre componentele materiei vii, cît şi dintre materia vie şi materia nevie a protoplasmei prezintă un interes deosebit" [10, p. 8].

c.7. — Bazată pe această concluzie (3.6), teoria structurii admite că metabolismul scăzut furnizează mai puțin din energia necesară menținerii stabilității și integrității structurii materiei vii, iar structura devenind mai puțin stabilă, eliberează o parte de potasiu și apă; potasiul eliberat difuzează din protoplasmă în lichidul interstițial, pe cînd apa eliberată diluează materia nevie și face ca ionii de sodiu să pătrundă în celulă din lichidul interstițial. De aici :

Concluzia 3.7. — Inhibarea metabolismului duce la scăderea stabilității structurii materiei vii, și la eliberarea parțială a potasiului și apei din această structură ceea ce face să scadă asimetria distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă (ansamblul protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular).

4. REPERCUSIUNEA EXCITĂRII ȘI MORȚII CELULELOR ASUPRA DISTRIBUȚIEI SODIULUI ȘI POTASIULUI ÎNTRE PROTOPLASMĂ ȘI LICHIDUL INTERSTIȚIAL

În legătură cu repercusiunea excitării și morții celulelor asupra repartiției sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial, vom lua în considerație două fapte experimentale, recunoscute unanim, și rezultate din numeroasele investigații efectuate de mai mulți autori, prin metode diferite și pe material biologic variat :

Al V-lea fapt experimental

În excitație sau în lezarea reversibilă a celulelor se constată ieșirea potasiului din protoplasmă în lichidul interstițial și pătrunderea sodiului din lichidul interstițial în protoplasmă. Mersul acestor fenomene se inversează după încetarea stării de excitație sau de lezare.

„Ieșirea potasiului și totodată îmbogățirea mușchilor în clor și sodiu în starea de excitație provocată de excitarea directă și indirectă (prin nerv), a fost descrisă de mulți cercetători, stabilindu-se totodată că procesul acesta este reversibil. După încetarea excitării, potasiul pătrunde înapoi în mușchi... iar clorul și sodiul ies afară... Aceste fenomene se observă atît la animalele cu sînge rece, cît și la cele cu sînge cald... Fenomene analoage au fost descoperite și în excitarea nervilor. Aici, ca și în fibrele musculare, în stare de excitare potasiul începe să părăsească protoplasma fibrelor nervoase" [1, p. 158].

„Noi știm că în excitarea celulelor potasiul și fosfații ies din ele, iar sodiul și clorul pătrund parțial în ele ; în timpul repausului se observă deplasarea inversă a acestor ioni..." [1, p. 108].

„...în stare de excitare sau lezare, unii electroliți ies din celulă, iar apoi în stare de repaus se întorc înapoi" [1, p. 177].

„Mulți cercetători au arătat că în excitare, simultan cu ieșirea afară a potasiului și fosfaților, se constată difuzia spre interiorul protoplasmei a sodiului și clorului" [1, p. 159].

„În afară de aceasta, se știe că în excitare potasiul iese din celule în mare cantitate" [1, p. 203].

Al VI-lea fapt experimental

După moartea celulelor, starea de distribuţie asimetrică a sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial încetează, repartiţia concentraţiilor acestor elemente devenind corespunzătoare echilibrului de difuzie.

„După moartea celulei, potasiul şi fosfaţii ies, iar sodiul şi clorul pătrund în celulă şi aceasta se produce atîta timp pînă se stabileşte echilibrul de difuzie" [1, p. 143].

Ca şi primele patru, tot aşa şi aceste două fapte experimentale — examinate prin prizma fiecăreia dintre teorii — duc la concluzii diferite. Numai că, în cazul acesta, concluziile se referă la :

c.8. — Formaţiunea celulară ale cărei însuşiri, modificîndu-se sub acţiunea excitării şi lezării reversibile, influenţează distribuţia sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial.

c.9. — natura modificărilor care, producîndu-se sub acţiunea excitării şi lezării reversibile a celulelor, influenţează distribuţia sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial.

c.10. —Fenomenul care determină încetarea asimetriei distribuţiei sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial, după moartea celulei.

Teoria membranei

c.8. şi c.9. — Teoria membranei admite că factorul principal care condiţionează distribuţia asimetrică a electroliţilor dintre mediile intra- şi extracelular este membrana electrică celulară (postulatul 1.4.) şi că dezechilibrul concentraţiilor ionice dintre protoplasmă şi lichidul interstiţial se realizează şi se menţine datorită anumitor însuşiri speciale ale acestei membrane (concluzia 1.4). Or, din moment ce în excitaţie sau lezare reversibilă, ionii de sodiu pătrund în celule, iar cei de potasiu ies din celule (al V-lea fapt experimental), adică distribuţia este modificată înseamnă că în aceste împrejurări se produc modificări reversibile la nivelul factorilor de care depinde asimetria distribuţiei electroliţilor între celule şi mediu. De aici se desprind două concluzii :

Concluzia 1.8. — Formaţiunea celulară ale cărei însuşiri se modifică sub acţiunea excitării şi lezării reversibile, influenţînd distribuţia sodiului şi potasiului între protoplasmă (lichidul intracelular) şi lichidul interstiţial (extracelular) este membrana electrică celulară (adică periferia celulei).

Concluzia 1.9. — Excitarea şi lezarea reversibilă a celulei determină o creştere a permeabilităţii membranei electrice celulare şi permite pătrunderea mai intensă a ionilor de sodiu din lichidul interstiţial (extrace-

lular) în protoplasmă (lichidul intracelular) precum și ieșirea mai intensă a ionilor de potasiu din protoplasmă în lichidul interstițial condiționînd astfel micșorarea asimetriei distribuției acestor ioni între celulă și mediu.

„Ieșirea unor substanțe din celulele excitate (potasiu, fosfați) teoria membranei o explică prin creșterea permeabilității membranelor" [1, p. 173].

„Prin lezare, membrana devine ușor permeabilă pentru toți ionii și astfel electroliții celulei ies liber afară, iar electroliții mediului difuzează înăuntru" [1, p. 144].

„Prin lezare sau excitare membranele devin permeabile pentru toți ionii" [1, p. 186].

„Din punctul de vedere al teoriei membranei, ieșirea potasiului și fosfaților din celule este considerată de obicei ca o consecință a creșterii permeabilității membranelor celulelor excitate" [1, p. 158].

„Teoria membranei, dominantă în fiziologia contemporană, consideră apariția stării de excitație a celulei și apariția potențialelor bioelectrice ca rezultat al creșterii permeabilității membranei superficiale celulare" [1, p. 372].

c.10. — Din moment ce după moartea celulei distribuția asimetrică a sodiului și potasiului încetează (al VI-lea fapt experimental), adică concentrațiile ionilor acestor elemente în protoplasmă (lichidul intracelular) și în lichidul interstițial (extracelular) se egalează, înseamnă că, o dată cu moartea celulei, factorii care determină asimetria distribuției menționate încetează să funcționeze. Astfel ținînd seama de postulatul 1.4 și concluzia 1.4. se ajunge la:

Concluzia 1.10. — După moartea celulei, asimetria distribuției sodiului și potasiului între celulă și mediu încetează, datorită permeabilizării totale a membranei electrice celulare și încetării activității pompei de sodiu.

Teoria sorbției

c.8. și c.9. — Teoria sorbției admite că factorul principal care condiționează distribuția asimetrică a electroliților între protoplasmă și lichidul interstițial (extracelular) este însușirea de sorbție a protoplasmei (a coacervatului protoplasmatic; postulatul 2.4) și că repartiția inegală a sodiului și potasiului se realizează și se menține datorită atît legării potasiului de către proteinele protoplasmei (coacervatului protoplasmatic; concluzia 2.4), cît și însușirilor de fază ale coacervatului protoplasmatic, în apa căruia electroliții se dizolvă mai greu decît în apa soluției înconjurătoare (concluzia 2.2). Or, din moment ce în excitație sau lezare reversibilă ionii de sodiu pătrund în celule, iar cei de potasiu ies din celule (al V-lea fapt experimental), înseamnă că în aceste împrejurări se produc modificări la nivelul factorilor de care depinde asimetria distribuției electroliților între celule și mediu.

Analiza acestor considerații în legătură cu problema biopotențialelor electrice va forma obiectul unei alte lucrări. De aici se desprind două concluzii :

Concluzia 2.8. — Formațiunea celulară ale cărei însușiri se modifică sub acțiunea excitării și lezării reversibile, influențînd distribuția sodiului și potasiului între protoplasmă (coacervatul protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular) este coacervatul protoplasmatic (adică masa celulei) *.

Concluzia 2.9. — Excitarea și lezarea reversibilă a celulei determină atît denaturarea reversibilă a proteinelor coacervatului protoplasmatic și prin aceasta scăderea capacității lor de a lega potasiul (*a*), cît și pierderea parțială a însușirilor de fază ale acestui coacervat, și deci creșterea solubilității electroliților în apa lui (*b*), ceea ce duce la micșorarea asimetriei distribuției sodiului și potasiului între celulă și mediu.

(*a*) „Ieșirea potasiului și fosfaților din celule în cazul excitării, este considerată din punctul de vedere al teoriei membranei, ca rezultatul creșterii permeabilității membranelor celulare excitate. Din punctul nostru de vedere (adică din punctul de vedere al teoriei sorbției), nu este vorba de creșterea permeabilității membranei superficiale, ci de liberarea potasiului și fosfaților legați de proteinele protoplasmei" [1, p. 158].

„Prin lezare sau excitare (datorită probabil modificărilor reversibile, apropiate ca natură de stadiile inițiale ale denaturării), proteinele își pierd însușirea de a lega acești ioni (potasiu și fosfați) și ei difuzează liber afară. După încetarea stării de excitație, proteinele protoplasmei își recapătă însușirea de a lega potasiul și fosfații" [1, p. 159].

„Prin lezare și excitare, fracția neionizată a potasiului și fosfaților, strîns legată de protoplasmă, se eliberează și trece în stare solvită, ionizată. Această trecere este reversibilă. După încetarea stării de excitație sau de lezare reversibilă, potasiul și fosfații eliberați se leagă din nou de protoplasmă" [1, p. 166].

„În momentul excitării, substanțele puternic legate de protoplasmă trec parțial în soluție... Eliberarea substanțelor legate de proteinele protoplasmei, în caz de excitație, reprezintă acel mecanism care..." [1, p. 176].

„Cantitatea substanței strîns legate (de substrat proteic) depinde prea puțin de concentrația ei în soluția înconjurătoare. Probabil în această stare substanțele sînt puțin active din punct de vedere chimic, însă pot trece în soluția liberă în lezare sau excitare" [1, p. 174].

„Sînt motive de a bănui că, în urma modificărilor de denaturare a proteinelor protoplasmei ce apar în excitație, se eliberează unele substanțe, care în stare de repaus au fost legate de

*) În teoria sorbției se consideră că excitarea, respectiv lezarea reversibilă a celulei determină o modificare a proteinelor protoplasmei (coacervatului protoplasmatic), asemănătoare cu denaturarea proteinelor native: „... cercetarea alterării protoplasmei prin excitare locală a permis să conchidem că modificările paranecrotice ale protoplasmei reprezintă rezultatul modificărilor reversibile ale proteinelor ei, apropiate ca natură de denaturarea proteinelor native. De asemenea, au fost adunate date care arată că denaturarea reversibilă a proteinelor protoplasmei se află la baza nu numai a excitației locale, dar și a celei celulare" [1, p. 371–372].

proteine (de exemplu : potasiul, fosfații, creatina). Este posibil că pe aceasta se bazează mecanismul de declanșare care dă impulsul dezvoltării unor procese biochimice" [1, p. 372].

„Noi am adus date, după care prin lezare sau în stare de excitare... se eliberează electroliți legați de ea și trec în simpla soluție apoasă" [1, p. 180].

„În partea precedentă au fost aduse datele după care în excitare, la fel ca și în lezare, se eliberează electroliții legați" [1, p. 186].

(*b*) „În lezare și excitație, protoplasma își pierde însușirile sale de fază și solubilitatea ionilor în ea crește. De aceea, ionii clorului și sodiul se îndreaptă spre interiorul celulei. Procesul acesta este reversibil. Astfel, direcția difuziei electroliților (în celulă sau din celulă) este determinată de modificările coeficientului de repartiție fie în favoarea mediului, fie în favoarea celulei" [1, p. 167].

„Prin excitare, la fel ca și prin lezare, protoplasma începe să-și piardă însușirile sale de fază, ceea ce face ca însușirea ei de a dizolva substanțe crește (K se apropie de unitate). În felul acesta se poate explica difuzia Na^+ și Cl^- în celule în stare de excitare, lezare reversibilă și moarte" [1, p. 176].

„Este destul de probabil, deși lucrul acesta nu este dovedit, că în regiunea excitată protoplasma își pierde însușirile sale de fază" [1, p. 186].

„Prin lezare, protoplasma își pierde însușirile sale de fază, iar electroliții legați de proteine (mai ales sărurile de potasiu ale fosfaților) se eliberează și trec în soluție" [1, p. 185].

Această *concluzie ipotetică* 2.9 bazată pe postulatele teoriei sorbției și concluziile ei 2.2 și 2.4, este cîteodată prezentată ca ceva cert, ceea ce nu este just și poate induce în eroare pe unii cercetători. Citãm, spre exemplificare, două texte, subliniind pasajele respective :

„*Se știe* că sub acțiunea excitanților și prin moarte, protoplasma își pierde însușirile ei de fază și substanțele încep să se dizolve în apa ei, la fel ca în apa mediului înconjurător" [1, p. 159]. „*Noi am adus date*, după care... prin lezare sau în stare de excitație protoplasma își pierde însușirile sale de fază și..." [1, p. 180]. Or, din moment ce „pierderea însușirilor de fază ale protoplasmei reprezintă numai o interpretare a unor date experimentale prin prizma anumitor postulate și concluzii ipotetice, înseamnă că și interpretarea respectivă este o ipoteză. De altfel, aceasta se recunoaște chiar în același volum printr-un alt text, și anume : „Este destul de probabil, *deși lucrul acesta nu este dovedit*, că regiunea excitată a protoplasmei își pierde însușirile sale de fază" [1, p. 186].

c.10. — În cazul morții celulei, asimetria distribuției sodiului și potasiului încetează (al VI-lea fapt experimental), adică repartiția acestor elemente între celulă și mediu se egalează. Aceasta înseamnă că o dată cu moartea celulei, factorii care determină asimetria distribuției menționate încetează să funcționeze. Astfel ținînd seama de postulatul 2.4 și de concluzia 2.4 se ajunge la :

Concluzia 2.10. — După moartea celulei, asimetria distribuției sodiului și potasiului între celulă și mediu încetează datorită pierderii însușirilor de sorbție ale coacervatului protoplasmatic.

Teoria structurii

c.8. şi c.9. — Teoria structurii admite că factorul principal care condiţionează distribuţia asimetrică a electroliţilor între protoplasmă (ansamblul protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular) este structura materiei vii (postulatul 3.4) şi că repartiţia inegală a sodiului şi potasiului se realizează şi se menţine datorită includerii unei părţi a potasiului celular şi a apei (precum şi a unei mici părţi a sodiului celular) în structura acestei materii (concluzia 3.4). Or, din moment ce în excitaţie sau lezare reversibilă ionii de sodiu pătrund în celulă, iar cei de potasiu ies din celulă (al V-lea fapt experimental), înseamnă că în aceste împrejurări se produc modificări reversibile la nivelul factorilor de care depinde asimetria distribuţiei electroliţilor dintre celule şi mediu.

De aici se desprind două concluzii :

Concluzia 3.8. — Formaţiunea celulară ale cărei însuşiri se modifică sub acţiunea excitării sau lezării reversibile, influenţînd distribuţia sodiului şi potasiului între protoplasmă (ansamblul protoplasmatic) şi lichidul interstiţial (extracelular), este materia vie din protoplasmă (adică o parte a masei celulare).

„Să luăm întîi în consideraţie că numai protoplasma vie prezintă însuşirea excitabilităţii deoarece numai ea răspunde într-un mod cu totul caracteristic la acţiunea agenţilor excitanţi ; după moartea protoplasmei, ea, ca orice formaţiune alcătuită numai din materie nevie, este indiferentă la acţiunea acestor agenţi. Cum, în conformitate cu ipoteza noastră, protoplasma vie este alcătuită atît din materie vie cît şi din materie nevie, şi cum materia nevie ca atare nu răspunde la acţiunea agenţilor excitanţi, înseamnă că însuşirea specifică a protoplasmei de a răspunde în mod caracteristic la acţiunea agenţilor excitanţi se datoreşte materiei vii pe care o conţine" [10, p. 5].

Concluzia 3.9. — Excitarea şi lezarea reversibilă a celulei determină o dezmembrare parţială a structurii materiei vii, cu punerea în libertate a unei părţi din potasiul şi din apa ei, ceea ce duce la pătrunderea ionilor de sodiu în celulă şi la ieşirea ionilor de potasiu din ea, şi condiţionează astfel micşorarea asimetriei distribuţiei sodiului şi potasiului între celulă şi mediu.

c.10. — În cazul morţii celulei, asimetria distribuţiei sodiului şi potasiului încetează (al VI-lea fapt experimental), adică repartiţia acestor elemente dintre celule şi mediu se egalează. Aceasta înseamnă că o dată cu moartea celulei factorii care determină asimetria distribuţiei menţionate încetează să funcţioneze. Astfel, ţinînd seama de postulatul 3.4 şi de concluzia 3.4. se ajunge la :

Concluzia 3.10. — După moartea celulei, asimetria distribuţiei sodiului şi potasiului între celulă şi mediu încetează, datorită dezmembrării structurii materiei vii din protoplasmă.

„...moartea depinde de destrămarea structurii materiei vii, cu care ocazie din această structură se eliberează compușii chimici din care a fost alcătuită" [10, p. 5].

ÎNCHEIERE

Lucrarea de față a avut ca obiect prezentarea bazelor unei noi teorii a permeabilității celulare — *teoria structurii* — și compararea lor cu bazele teoriilor membranei și sorbției.

Pentru a ușura această comparare atît la nivelul postulatelor acestor trei teorii, cît și la nivelul concluziilor la care ele ajung prin interpretarea diferitelor fapte experimentale, a fost întocmit un tablou, aflat la sfîrșitul acestei lucrări.

Postulatele teoriilor luate în considerație, se deosebesc profund între ele. Fiecare teorie atribuie protoplasmei o natură diferită (lichid protoplasmatic ; coacervat protoplasmatic ; ansamblu protoplasmatic), consideră în mod diferit starea și însușirile apei protoplasmatice (apa liberă a lichidului intracelular ; apa legată a coacervatului protoplasmatic ; apa integrată în structura materiei vii, apa de imbibiție a materiei vii și apa liberă a materiei nevii), se bazează pe concepții diferite cu privire la starea electroliților din protoplasmă (dizolvați și total disociați ; legați de proteine, absorbiți pe coloizi, dizolvați în stare disociată în apa legată a coacervatului protoplasmatic ; integrați în structura materiei vii, adsorbiți pe materia vie și pe coloizii materiei nevii, precum și dizolvați în stare disociată atît în apa de imbibiție a materiei vii cît și în apa liberă a materiei nevii) și atribuie unor factori diferiți rolul principal în condiționarea asimetriei distribuției electroliților între protoplasmă și lichidul interstițial (membrana electrică celulară ; sorbția coacervatului protoplasmatic ; structura materiei vii).

De asemenea, se constată că cele trei teorii ajung la concluzii cu totul diferite cînd examinează, interpretează și explică anumite fapte experimentale în legătură cu distribuția asimetrică a sodiului și potasiului între protoplasma și lichidul interstițial, cu membranele celulare cu energia metabolică, precum și cu excitarea, lezarea reversibilă și moartea celulelor.

Se înțelege că fiind deduse pe baza postulatelor teoriilor respective, aceste concluzii reprezintă numai ipoteze, a căror justețe este cu atît mai probabilă cu cît postulatele din care ele izvorăsc sînt mai aproape de realitate.

În lucrările viitoare vom trece la dezvoltarea teoriei structurii, ale cărei baze au fost prezentate aici.

Prezentată la redacție
la 28 august 1965

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
și
Catedra de biochimie de la Facultatea de Biologie a Universității București

PREZENTAREA COMPARATIVĂ A BAZELOR TEORIILOR MEMBRANEI, SORBȚIEI ȘI STRUCTURII

A. Postulate

Nr.	Postulatul cu privire la :	Teoria membranei	Teoria sorbției	Teoria structurii
1	2	3	4	5
p. 1.	Natura protoplasmei	1.1. Protoplasma este o soluție apoasă (lichid intracelular)	2.1. Protoplasma este un coacervat complex (coacervat protoplasmatic)	3.1. Protoplasma este un ansamblu alcătuit din materie vie și materie nevie (ansamblu protoplasmatic)
p. 2.	Apa protoplasmei	1.2. Toată apa protoplasmei (lichidului intracelular) este liberă și nu se deosebește ca stare și însușiri de apa obișnuită	2.2. Toată apa protoplasmei (coacervatului protoplasmatic) este legată și de aceea se deosebește ca stare și însușiri de apa obișnuită, comportîndu-se ca o fază aparte și ca un solvent mai slab	3.2. Apa protoplasmei (ansamblului protoplasmatic) se află sub trei forme diferite : o parte este integrată în structura materiei vii și nu are însușiri de solvent ; o altă parte îmbibă materia vie (apa de imbibiție) și se comportă ca un fel de apă legată, deosebită ca fază și ca însușiri de solvent de apa obișnuită ; în fine, o parte se află în materia nevie a protoplasmei, comportîndu-se ca apa liberă obișnuită
p. 3.	Electroliții protoplasmei	1.3. Electroliții protoplasmei (lichidului intracelular) sînt dizolvați integral în apa liberă a lichidului intracelular în care se află în stare disociată ca ioni difuzibili	2.3. Electroliții protoplasmei (coacervatului protoplasmatic) sînt în parte legați stabil de proteine, în parte adsorbiți reversibil pe micele coloidale și numai în parte dizolvați în apa legată a coacervatului protoplasmatic, în care se află în stare disociată ca ioni difuzibili	3.3. Electroliții protoplasmei (ansamblului protoplasmatic) sînt în parte integrați în structura materiei vii, în parte sînt adsorbiți la nivelul materiei vii și pe coloizii aflați în materia nevie și numai în parte sînt dizolvați atît în apa de imbibiție a materiei vii, cît și în apa libe-

(continuare)

Nr.	Postulatul cu privire la:	Teoria membranei	Teoria sorbției	Teoria structurii
1	2	3	4	5
				ră a materiei nevii, aflîndu-se în acestea în stare disociată ca ioni difuzibili
p. 4.	Factorul principal care determină asimetria distribuției electroliților dintre protoplasmă și lichidul interstițial	1.4. Membrana electrică celulară care învăluește protoplasma	2.4. Sorbția coacervatului protoplasmatic	3.4. Structura materiei vii

B. Concluzii

Nr.	Concluzia cu privire la:	Teoria membranei	Teoria sorbției	Teoria structurii
1	2	3	4	5
c. 1.	Concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în protoplasmă și lichidul interstițial	1.1. Concentrația ionilor de sodiu în protoplasmă (lichidul intracelular) este mult mai mică, iar concentrația ionilor de potasiu este mult mai mare decît în lichidul interstițial (extracelular), deși solubilitatea electroliților în cele două lichide este aceeași $[Na^+]_i < [Na^+]_e$, $[K^+]_i > [K^+]_e$.	2.1. Concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în apa protoplasmei (apa coacervatului protoplasmatic) sînt mai mici decît în lichidul interstițial (extracelular) corespunzător solubilităților diferite ale electroliților în cele două medii nemiscibile $[Na^+]_i < [Na^+]_e$, $[K^+]_i < [K^+]_e$.	3.1. Concentrațiile ionilor de sodiu și potasiu în apa liberă a materiei nevii din protoplasmă sînt principial egale cu acelea din lichidul interstițial (extracelular), iar concentrațiile lor în apa de imbibiție a materiei vii diferă de acelea din lichidul interstițial și din apa liberă a materiei nevii, corespunzător solubilităților diferite ale electroliților în mediile respective $[Na^+]_n = [Na^+]_e$ $[K^+]_n = [K^+]_e$ $[Na^+]_b \neq [Na^+]_e$ $[K^+]_b \neq [K^+]_e$ $[Na^+]_b \neq [Na^+]_n$ $[K^+]_b \neq [K^+]_n$.

(continuare)

Nr.	Concluzia cu privire la :	Teoria membranei	Teoria sorbţiei	Teoria structurii
1	2	3	4	5
c. 2.	Trecerea ionilor de sodiu şi potasiu din lichidul interstiţial în protoplasmă, şi invers	1.2. Trecerea ionilor de sodiu şi potasiu prin membrana electrică celulară, din lichidul interstiţial (extracelular) în protoplasmă (lichid intracelular) şi invers, se face ca între două soluţii apoase separate printr-o membrană permeabilă pentru ambii ioni	2.2. Trecerea ionilor de sodiu şi potasiu din lichidul interstiţial (extracelular) în protoplasmă (apa coacervatului protoplasmatic) şi invers, se face ca între două faze nemiscibile, în care electroliţii au solubilităţi diferite	3.2. Trecerea ionilor de sodiu şi potasiu din lichidul interstiţial (extracelular) în apa liberă a materiei nevii din protoplasmă şi invers, se face ca între două soluţii apoase separate prin membrană permeabilă, materia vie fiind şi ea permeabilă pentru aceşti ioni. În schimb, trecerea aceloraşi ioni din lichidul interstiţial şi din apa liberă a materiei nevii în apa de imbibiţie a materiei vii şi invers, se face ca între două faze nemiscibile, în care electroliţii au solubilităţi diferite.
c. 3.	Raportul dintre concentraţiile ionilor de sodiu şi potasiu în protoplasmă şi lichidul interstiţial	1.3. Raportul dintre concentraţiile inegale ale ionilor de sodiu şi potasiu în protoplasmă (lichid intracelular) şi lichidul interstiţial (extracelular) corespunde unei stări de dezechilibru	2.3. Raportul dintre concentraţiile inegale ale ionilor de sodiu, respectiv de potasiu, în apa protoplasmei (apa legată a coacervatului protoplasmatic) şi în lichidul interstiţial (extracelular) corespunde unei stări de echilibru Henri	3.3. Raportul dintre concentraţiile egale ale ionilor de sodiu, respectiv de potasiu, în apa liberă a materiei nevii din protoplasmă şi în lichidul interstiţial, corespunde unei stări de echilibru de difuzie ; el poate să corespundă însă şi altor echilibre ca de exemplu echilibrului Donnan, cînd datorită impermeabilizării membranelor celulare pentru co-

(continuare)

Nr.	Concluzia cu privire la :	Teoria membranei	Teoria sorbţiei	Teoria structurii
1	2	3	4	5
				loizi şi încărcării materiei nevii cu proteine, concentraţiile ionilor menţionaţi devin inegale. În acelaşi timp, raportul dintre concentraţiile inegale ale aceloraşi ioni în apa de imbibiţie a materiei vii şi în lichidul interstiţial, respectiv în apa liberă a materiei nevii, corespunde unei stări de „echilibru complex".
c.4.	Factorul care realizează şi menţine distribuţia asimetrică a sodiului şi potasiului între protoplasmă şi lichidul interstiţial	1.4. Capacitatea specială a membranei electrice celulare de a transporta continuu şi selectiv ionii de sodiu din protoplasmă în lichidul interstiţial, iar ionii de potasiu în sens invers	2.4. Legarea unei părţi a potasiului şi chiar a sodiului din protoplasmă de către proteinele coacervatului protoplasmatic, absorbţia sodiului şi potasiului pe micelele coloidale ale coacervatului protoplasmatic şi solubilităţii mai mici a electroliţilor cu sodiu şi potasiu în apa legată a coacervatului protoplasmatic decît în lichidul interstiţial.	3.4. Includerea unei părţi a potasiului şi sodiului celular în structura materiei vii, ca componente ale acesteia, adsorbţia sodiului şi potasiului la nivelul materiei vii şi al coloizilor aflaţi în materia nevie a protoplasmei şi solubilitatea diferită a electroliţilor de sodiu şi potasiu în apa de imbibiţie a materiei vii din protoplasmă decît în apa liberă a materiei nevii sau a lichidului interstiţial. Pot însă interveni şi alţi factori, ca de exemplu scăderea concentraţiei ionilor de sodiu şi potasiu în apa

(continuare)

Nr.	Concluzia cu privire la :	Teoria membranei	Teoria sorbției	Teoria structurii
1	2	3	4	5
				liberă a materiei nevii, în condițiile stabilirii echilibrului Donnan etc.
c. 5.	Rolul membranelor celulare în repartiția concentrațiilor ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă și lichidul interstițial	1.5. Membrana electrică celulară cuprinde în structura ei un anumit mecanism, numit „pompa de sodiu", care asigură transportul activ, selectiv și în sensuri opuse al ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă (lichidul intracelular) și lichidul interstițial (extracelular), intervenind astfel activ în repartiția concentrațiilor acestor ioni între mediile intra- și intercelular.	2.5. Membranele celulare nu intervin activ și nu au vreun rol special în repartiția concentrațiilor ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă (apa legată a coacervatului protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular)	3.5. Membranele celulare nu intervin activ în repartiția concentrațiilor ionilor de sodiu și potasiu între protoplasmă (apa liberă a materiei nevii și apa de imbibiție a materiei vii) și lichidul interstițial (extracelular), dar pot influența această repartiție, pe măsura schimbării însușirilor lor în funcție de metabolism
c. 6.	Rolul energiei provenite din metabolism în distribuția sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial	1.6. Ea pune și menține în funcție „pompa de sodiu" localizată în membrana electrică celulară, care transportînd activ și permanent în sensuri opuse ionii de sodiu și potasiu dintre celulă și mediu, asigură repartiția inegală a acestor ioni între protoplasmă (lichidul intracelular) și lichidul interstițial (extracelular)	2.6. Ea menține însușirile diferențiat ale sorbției coacervatului protoplasmatic determinate de structura sa fizico chimică, însușiri datorită cărora se asigură asimetria distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă (coacervatul protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular)	3.6. Ea menține structura materiei vii în care este integrată o bună parte atît a potasiului celular, cît și a apei (precum și o mică parte a sodiului), ceea ce asigură asimetria distribuției electroliților respectivi între protoplasmă și lichidul interstițial (extracelular)

(continuare)

Nr.	Concluzia cu privire la :	Teoria membranei	Teoria sorbției	Teoria structurii
1	2	3	4	5
c. 7.	Repercusiunea inhibării metabolismului asupra asimetriei distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial	1.7. Scăderea activității pompei de sodiu din membrana electrică celulară și, prin aceasta, în modificarea raporturilor dintre electroliții intra- și intercelulari, în sensul micșorării asimetrei distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă (lichidul intra-celular) și lichidul interstițial (extracelular)	2.7. Estomparea însușirilor de sorbție ale protoplasmei (coacervatului protoplasmatic) și prin aceasta, redistribuirea electroliților intra- și extracelulari în sensul micșorării asimetriei distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă (coacervatul protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular)	3.7. Scăderea stabilității structurii materiei vii și eliberarea parțială a potasiului și a apei din această structură, ceea ce face să scadă asimetria distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă (ansamblul protoplasmatic) și lichidul interstițial (extracelular)
c. 8.	Formațiunea celulară ale cărei însușiri, modificîndu-se sub acțiunea excitării și lezării reversibile, influențează distribuția sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial.	1.8. Membrana electrică celulară (adică periferia celulei).	2.8. Coacervatul protoplasmatic (adică masa celulei).	3.8. Materia vie din protoplasmă (adică o parte a masei celulare).
c. 9.	Natura modificărilor care, producîndu-se sub acțiunea excitării și lezării reversibile a celulelor, influențează distribuția sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial.	1.9. Creșterea permeabilității membranei electrice celulare permite pătrunderea mai intensă a ionilor de sodiu din lichidul interstițial (extracelular) în protoplasmă (lichidul intracelular) și ieșirea mai intensă a ionilor de potasiu din protoplasmă în lichidul interstițial, condiționînd astfel micșorarea	2.9. Denaturarea reversibilă a proteinelor coacervatului protoplasmatic însoțită de scăderea capacității lor de a lega potasiul și pierderea parțială a însușirilor de fază ale acestui coacervat însoțită de creșterea solubilității electroliților în apa lui, duc la micșorarea asimetriei distribuției sodiului și	3.9. Destrămarea parțială a structurii materiei vii, cu punerea în libertate a unei părți a potasiului și a apei, duce la pătrunderea ionilor de sodiu în celulă și la ieșirea ionilor de potasiu din ea, condiționînd astfel micșorarea asimetriei distribuției sodiului și potasiului între celulă și mediu.

(continuare)

Nr.	Concluzia cu privire la :	Teoria membranei	Teoria sorbției	Teoria structurii
1	2	3	4	5
		asimetriei distribuției acestor ioni între celulă și mediu.	potasiului între celulă și mediu.	
c.10.	Fenomenul care determină încetarea asimetriei distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial după moartea celulei.	1.10. Permeabilizarea totală a membranei electrice celulare și încetarea activității pompei de sodiu.	2.10. Pierderea însușirilor de sorbție ale coacervatului protoplasmatic.	3.10. Destrămarea structurii materiei vii din protoplasmă.

Bibliografie

1. D. N. Nasonov. *Mestnaia reacția protoplasmi i rasprostraneaiusceesea vozbujdenie*, Izd. Acad. Nauk SSSR, Moskva-Leningrad, 1959.
2. J. Walter Woodbury, *Proprietățile biofizice ale membranei celulare : membrana celulară, gradienții ionici și de potențial și transportul activ*, în *Fiziologia medicală și biofizică*, de Th. C. Ruth și J. F. Fulton, Edit. med., București, 1963, p. 28—68.
3. E. Macovschi, *Materia vie și geneza ei*, în *Materialismul dialectic și științele contemporane ale naturii*, Ed. Politică, București, 1959, p. 155.
4. — *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Revue de Chimie, **4**, *1*, 11 (1959).
5. — *Materia vie și rolul ei în hibridarea plantelor*, St. cerc. biochim., **6**, *4*, 467 (1963).
6. — *Einige neue Anschauungen über die Natur der lebenden Materie in Beziehung zur Biochemie des Krebses*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **VIII**, *2(34)*, 48 (1963).
7. — *La structure de la matière vivante et quelques aspects cybernétiques de ce problème (Note préliminaire)*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **IX**, *2(40)*, 39 (1964).
8. — *Unele aspecte cibernetice în problema structurii materiei vii*, St. cerc. biochim., **VII**, *1*, 5 (1964). *Nekotorîe aspekti kibernetiki i struktura jivoi materii*, Rev. roum. Biochim., **I**, *1*, 5 (1964).
9. — *Kybernetik im Organismischen*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **IX**, *3(41)*, 89 (1964).
10. — *Unele probleme ale mecanismelor de reglare și ale structurii materiei vii*, St. cerc. biochim , **8**, *3*, 342 (1965).
11. — *Unele considerații cu privire la problema membranelor celulare și a permeabilității lor*, St. cerc. biochim., **4**, *1*, 9 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 411 - 414, (1965)

CERCETĂRI ASUPRA PIGMENȚILOR DIN PLANTE ENDEMICE
II. CAROTINOIDELE DIN CÎTEVA SPECII ENDEMICE HIBRIDE ALE GENULUI *HIERACIUM*

GAVRIL NEAMȚU, VIRGIL TĂMAȘ ȘI CORNEL BODEA

561.19 : 577.1

Rezumat. — Au fost analizate carotinoidele din florile unor specii endemice hibride din genul *Hieracium*, recoltate din Parcul național Retezat. S-a găsit că între speciile analizate există numai deosebiri cantitative. Pigmenții principali ai acestor specii sînt dipalmitați de epoxizi ai luteinei și zeaxantinei, precum și dipalmitatul monoxidului furanoidic de luteină.

Într-o lucrare anterioară [1] s-a arătat că prin identificarea pigmenților carotinoidici în diferite plante endemice se aduce nu numai o contribuție la biochimia plantelor endemice, ci se deschid și perspective pentru noi surse de carotinoide.

Este știut că în țara noastră, ca urmare a condițiilor variate de climă și sol, a evoluției paleogeografice și a hibridării naturale, se găsesc un mare număr de plante endemice, dintre care un număr însemnat se află în munții Retezat [2]. Dintre diferitele genuri de plante predomină în mod autoritar genul *Hieracium*, pentru care munții Retezat reprezintă un adevărat centru genetic [3]. Din cele aproximativ 750 de specii principale și hibride ale genului *Hieracium* ce se cunosc pe continentul nostru, în munții Retezat se găsesc 307 specii, varietăți și forme, dintre care 88 sînt endemisme [4].

Caracteristic pentru genul *Hieracium* este faptul că atît speciile principale, cît mai ales speciile hibridogene formate se înmulțesc foarte ușor și prezintă o mare variabilitate de forme, ceea ce determină o densitate mărită a acestor specii.

Pînă în prezent nu s-au făcut cercetări asupra pigmenților carotinoidici din plantele genului *Hieracium*. Unii autori [5—7] menționează însă existența unor pigmenți galbeni necarotinoidici la speciile *H. siculum*, *H. pilozella* și *H. murorum*.

În lucrarea de față s-au urmărit, pe lîngă identificarea și dozarea pigmenților carotinoidici, și aspecte corelative dintre acești pigmenți și condițiile ecologice. S-au urmărit, de asemenea, identificarea unor carotinoide specifice genului *Hieracium*, precum și, eventual, aflarea unor

criterii biochimice pentru determinarea sistematică a diferitelor specii și forme ale acestui gen.

În cadrul acestei lucrări s-au analizat carotinoidele din florile speciilor de :

— *Hieracium chloribracteum* var. *basicoloratum*
— „ *filarszkyi*
— „ *napeum* var. *chloribracteiforme*
— „ *fritzeiforme* var. *poarta bucurae*.

Aceste specii hibride au în general flori de culoare galbenă, a căror nuanță însă diferă. Astfel, speciile de *H. chloribracteum* și *H. filarszkyi* au o culoare aurie și achene de culoare brună-roșcată, iar *H. napeum* și *H. fritzeiforme* au o culoare galbenă deschisă și achene de culoare brună-negricioasă.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat cu material recoltat din Parcul național Retezat în perioada 24 iulie — 5 august 1964. Materialul vegetal, după recoltare, a fost uscat la umbră în strat subțire, timp de 25 de zile, după care s-a prelucrat [8].

Pentru identificarea pigmenților s-au folosit 500 g de flori.

Materialul uscat s-a mărunțit bine prin frecare și mojarare cu praf de sticlă și nisip. Extragerea pigmenților s-a făcut cu amestec de acetonă, eter de petrol și benzen în proporție de 2 :4 :1. Aceeași operație s-a repetat de trei ori, pînă la extragerea completă a pigmenților. Extractele de pigmenți unificate s-au spălat cu apă distilată (30 de spălări în pîlnia de separare) pentru îndepărtarea acetonei. După spălare, extractul s-a trecut printr-un strat de Na_2SO_4 anhidru, pentru îndepărtarea completă a apei. S-a cromatografiat apoi pe coloană cu amestec adsorbant, format din MgO și nisip fin, în proporție de 1 :2 în greutate.

Cromatograma s-a developat cu amestec de eter de petrol 78%, benzen 20% și acetonă 2%. Pentru recromatografierea pigmenților, proporția de acetonă s-a mărit pînă la 6%.

Pigmenții au fost separați și eluați cu eter de petrol ce conține 5% etanol, spălați, uscați și recromatografiați.

Dozarea pigmenților s-a făcut colorimetric, utilizînd o soluție standard de azobenzen [9].

Identificarea pigmenților s-a făcut după maximele de absorbție în eter de petrol, repartizarea epi- sau hipofazică față de hexan-metanol 95% și cromatograme de amestec cu pigmenți autentici. Epoxizii și oxizii furanoidici au fost identificați și prin reacția de culoare cu HCl în soluție de eter etilic [10].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La analiza carotinoidelor din *H. filarszkyi* s-a obținut cromatograma prezentată în tabela nr. 1.

Pigmenții carotinoidici determinați în cele patru specii sînt redați în tabela nr. 2.

După cum rezultă din tabela nr. 2, în speciile de plante analizate se găsesc în cantitate mai mare epoxizi ai luteinei și zeaxantinei, precum și monoxidul furanoidic de luteină.

Tabela nr. 1

Cromatograma carotinoidelor din *H. filarszkyi* (40×6 cm) citită de sus în jos

Lăţimea zonei (în cm)	Culoarea	Carotenoidul	Maximele de absorbţie (în mμ)	Repartizarea în metanol 95%	Reacţia cu HCl
0,8	galben	violaxantină	465, 430	85%	albastru intens
0,3	galben	anteraxantină	472, 444	75%	albastru
3,0	portocaliu	zeaxantină	478, 450	70%	—
1,5	galben	dipalmitat de flavoxantină	450, 420	20%	albastru-verzui
4,0	galben	dipalmitat de eloxantină *(trans)*	466, 434	5%	albastru
1,0	portocaliu	dipalmitat de zeaxantină	478, 450	—	—
1,5	galben	dipalmitat de eloxantină *(cis)*	462, 432, 328	—	albastru
5,0	galben	dipalmitat de luteină	473, 443	—	—
5,0	interzonă				
1,5	portocaliu	palmitat de criptoxantină	478, 450	—	—
2,0	interzonă				
1,2	portocaliu	β-carotină	478, 450	—	—
1,0	interzonă				
0,5	galben	α-carotină	473, 443	—	—

Tabela nr. 2

Carotinoidele din cîteva specii de *Hieracium* (în mg la 100 g material uscat)

Carotinoidele	*H. chloribraeterum* var. *basicoloratum*	*H. filarszkyi*	*H. napeum* var. *chloribracteiforme*	*H. fritzeiforme* var. *poarta bucurae*
a. *Cu structură* α				
α-Carotină	0,03	0,028	0,08	0,05
Dipalmitat de luteină	1,05	1,02	1,26	1,30
Dipalmitat de eloxantină (*cis*)	0,4	0,36	0,50	0,50
Dipalmitat de eloxantină (*trans*)	2,35	2,20	2,55	2,64
Dipalmitat de flavoxantină	1,27	1,30	1,80	1,85
b. *Cu structură* β				
β-Carotină	0,20	0,26	0,16	0,18
Palmitat de criptoxantină	0,10	0,18	0,08	0,09
Dipalmitat de zeaxantină	0,80	0,70	0,55	0,60
Zeaxantină	1,75	2,50	0,90	1,00
Anteraxantină	0,84	0,70	0,80	0,82
Violaxantină	1,85	1,58	1,00	1,20

Speciile care au culoarea galbenă-aurie conțin o cantitate mai mare de carotinoide cu structură β, iar cele de culoare galbenă deschisă, cu structură α, nefiind însă deosebiri calitative între ele.

Pigmentul principal al acestor specii este dipalmitatul monoepoxidic al luteinei, care se numește obișnuit dipalmitat de eloxantină și se găsește atît sub forma *cis*, cît și *trans*. Acest pigment a mai fost identificat și în alte specii, ca *Tragopogon pratensis* [11], *Ranunculus acer* [11], *Elodeea canadensis* [12], *Trollius europaeus* și *Laburnum anagyroides* [13], specii ale căror flori au tot o culoare galbenă. Nu s-au găsit carotinoide cu sistem polienic mai bogat, normal sau retro și nici cu structură β.

CONCLUZII

Pigmentul principal al florilor plantelor studiate este dipalmitatul eloxantinei.

Carotinoidele identificate nu pot constitui un criteriu pentru determinarea diferitelor specii din genul *Hieracium*.

Mulțumim tov. prof. Anton Nyarady de la Institutul agronomic „Dr. Petru Groza" din Cluj pentru îndrumările date în obținerea și determinarea materialului vegetal.

Prezentat la redacție la 15 mai 1965.

Catedra de chimie și biochimie a Institutului agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. G. Neamțu, V. Tămaș și C. Bodea, *Cercetări asupra pigmenților din plante endemice. I. Carotinoidele din Astragalus Peterfii*, St. cerc. biochim., **8**, 1, 67 (1965).
2. E. Țopa, *Endemisme floristice în R.P.R.*, Natura, **XII**, 4, 72 (1960).
3. E. I. Nyarady, *Flora Republicii Populare Române*, vol. X, Edit. Acad. R.P.R., București, 1965, p. 214.
4. E. I. Nyarady, *Flora și vegetația munților Retezat*, Edit. Acad. R.P.R., București, 1958.
5. M. Churchet, *Recherches sur les chromoleucites*, Anal. Sci. nat., bot. Ger., **VII**, 7, 263 (1888).
6. C. Visselingh, *Über die Nachweisung und das Vorkommen von Carotinoiden in der Pflanze*, Flora, **107**, 371 (1915).
7. P. Duquenois, E. Greib, *Hieracium pilozella*, C.r., **237**, 1 354 (1953).
8. C. Bodea, E. Nicoară, J. Gross., *Asupra preparării α și β carotinei din materii vegetale*, St. cerc. științ. (Cluj), **1—2**, 73 (1954).
9. R. Kuhn, H. Brockmann, *Bestimmung von Carotinoiden*, Z. physiol. Chem., **206**, 41 (1932).
10. P. Karrer, E. Jucker, *Oxyde des β-carotins : β-carotin monoepoxid, β-carotin-di-epoxyd, Mutatochrom, Aurochrom, Luteochrom*, Helv. Chim. Acta, **28**, 427 (1945).
11. P. Karrer, E. Jucker, I. Rutschmann, K. Steilin, *Zur Kenntnis der Carotinoid-epoxyde Natürliches Vorkommen von Xanthophyll-epoxyd und α-Carotin-epoxyd*, Helv. Chim. Acta, **28**, 1 146 (1945).
12. P. Karrer, I. Rutschmann, *Über die Carotinoide aus Elodea canadensis*, Helv. Chim. Acta, **28**, 1 526 (1945).
13. P. Karrer, E. Jucker, *Über weitere Vorkommen von Carotinoid-epoxyden. Trollixanthin und Trollichrom*, Helv. Chim. Acta, **29**, 1 939 (1946).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 415–425 (1965)

BILANȚUL CALCIULUI LA OM ÎN CURSUL ACTIVITĂȚII MUSCULARE

IANCU GONȚEA, ALICE RUJINSKI, SEBASTIAN DUMITRACHE
și PARASCHIVA SUȚESCU

612.015.3.613.2

Rezumat. — Pe 22 de bărbați în vîrstă de 23–28 de ani și 60–77 kg, internați și alimentați timp de 28–36 de zile cu o dietă adecvată, care furniza 0,7–0,9 g Ca, 1,4–1,6 g P și 1 g de proteine pe kilocorp zilnic (aportul pentru același subiect fiind constant), s-au urmărit modificările survenite în bilanțul calciului la trecerea de la munca de tip sedentar (în laborator) la activitate musculară, efectuată timp de 8–20 de zile la cicloergometru (75–115 000 kgm în 6 ore), dozarea acestui element făcîndu-se atît în alimente, fecale și urină, cît și în sudoare, al cărei volum s-a aflat prin studiul bilanțului între intrate (apa, alimente, oxigen) și ieșite (fecale, urină, CO_2), ținînd seama de umiditatea aerului inspirat.

Activitatea musculară a mărit eliminările de calciu (prin fecale, sudoare și în parte prin urină) la toate persoanele, iar la 14 din 22 de experiențe pierderile au depășit cantitatea ingerată. Diferența dintre valoarea medie a bilanțului înainte ($+82 \pm 27$ mg) și după începerea activității musculare (-72 ± 32 mg) a fost statistic semnificativă ($p<0{,}001$). Menținînd aceleași condiții de aport, prin repetarea aceleiași activități musculare timp de 3 săptămîni (adaptare la efort și la aport), pierderile de calciu nu au scăzut semnificativ, însă prin ridicarea aportului la cel puțin 1,3 g pe zi s-a putut preveni negativarea bilanțului în 8 zile de activitate musculară.

Se demonstrează necesitatea determinării pierderilor prin sudoare pentru acuratețea bilanțului și se discută faptul că intensificarea metabolismului general în cursul activității musculare interesează și componente care nu participă direct la furnizarea energiei de contracție, scoțînd în evidență aplicarea practică a acestui efect.

În 1956 și 1957, cercetînd influența efortului fizic asupra bilanțului în fosfor la om [3], a trebuit ca în organizarea experiențelor să ținem seama de relațiile metabolice ale acestui element, pe de o parte, cu azotul, iar pe de altă parte cu calciul. Pentru ca influența efortului să poată fi atribuită activității musculare, a fost nevoie să se evite variațiile — în retenția sau pierderea de fosfor — consecutive unui aport diferit de azot sau de calciu. De aceea, în tot cursul determinărilor de bilanț, efectuate pe același subiect

timp de 28—36 de zile, dieta zilnică furniza pentru aceeași persoană cantități constante atît de fosfor (1,4—1,6 g), cît și de calciu (0,7—0,9 g) și de proteine (1 g/kilocorp), iar pentru a se înlătura intervenția unor factori alimentari în utilizarea digestivă a acestor trofine [1], la întocmirea meniului zilnic s-au folosit aceleași alimente în ambele forme de activitate [5].

Cu ocazia acestor cercetări am observat că, deși aportul de calciu și condițiile de utilizare digestivă erau constante, totuși, după trecerea de la o perioadă de muncă sedentară la alta cu cîte 6 ore de activitate musculară pe zi (executată la cicloergometru în 6 reprize de cîte 20 min de efort, separate prin pauze de cîte 1/2 oră), eliminările calciului creșteau. Această observație, sugerînd ideea existenței unei relații între metabolismul calciului și activitatea musculară, ne-a îndemnat ca în cadrul cercetărilor pe care le întreprindem asupra trebuințelor nutritive ale omului să studiem influența efortului fizic asupra bilanțului acestui element. Întrucît rezultatele primelor observații, care au constituit obiectul unui alt articol [7], au arătat că în 4—8 zile de activitate musculară eliminările de calciu au crescut la toate persoanele și că în 10 din 14 experiențe bilanțul s-a negativat, în prezenta lucrare s-au urmărit : *a*) verificarea autenticității rezultatelor obținute la primele observații ; *b*) efectul majorării aportului de calciu, spre a vedea dacă negativarea bilanțului se datorește insuficienței rației sau este consecința modificărilor psihoneuroendocrine determinate de efortul fizic, care ar putea acționa ca un „stress" ; *c*) influența adaptării la dietă și la muncă (antrenament) prin repetarea aceleiași activități musculare timp de 3 săptămîni, aportul de calciu menținîndu-se la nivelul rației recomandate ca optimă pentru adulți.

METODA ȘI CONDIȚII DE CERCETARE

Pentru ca variațiile survenite în mărimea pierderilor de calciu să poată fi atribuite activității musculare, și nu altor factori care influențează folosirea acestui element, în organizarea experiențelor a fost necesar să se respecte următoarele postulate :

1. Spre a se evita retenția pentru creștere sau restaurare, persoanele în observație trebuie să fie adulte (după terminarea dezvoltării rapide a scheletului) și să aibă o stare de nutriție bună, iar în cursul observațiilor dieta trebuie să asigure menținerea echilibrului nutrițional și constanța greutății corporale.

2. Aportul de calciu să corespundă rației recomandate pentru adulți (10—20 mg pe kilocorp) și să fie menținut la același nivel atît în munca sedentară (*perioada anteefort*), cît și în cursul activității musculare (*perioada de efort*).

3. Factorii alimentari care intervin în utilizarea digestivă sau metabolică a calciului (acid fitic, acid oxalic, grăsimi, fosfor, colecalciferol, lactoză, proteine etc.) să fie furnizați în aceleași proporții în ambele perioade, adică meniul să fie alcătuit din aceleași alimente.

4. Întrucît calciul se elimină și prin transpirație, pentru determinarea riguroasă a bilanțului, dozarea acestui element trebuie făcută nu numai în alimente, fecale și urină, ci și în sudoarea eliminată în cursul activității musculare intense [4], [6].

Cercetările s-au efectuat pe 22 de bărbați în vîrstă de 23—28 de ani (în medie 24) și în greutate de 60—77 kg (în medie 67). Fiecare persoană era internată și hrănită în labora-

[1] Expresie folosită de noi în locul aceleia de „factor" sau „principiu nutritiv".

torul catedrei în tot cursul observațiilor, care durau 28—36 de zile. Înaintea fiecărei observații se alegeau 20—25 de produse alimentare stocabile și, prin determinări repetate, se stabilea conținutul lor în calciu, fosfor și azot. Dieta zilnică furniza cîte 0,7—0,9 g (în medie 0,8 g) de calciu, 1,4—1,6 g de fosfor și 1 g de proteine pe kilocorp, dintre care 33—35% erau de origine animală. Meniul se stabilea pe 4 zile și apoi se repeta de 7—9 ori, fiecare formă de activitate durînd un număr întreg (3—5) de asemenea perioade. Pregătirea alimentelor s-a făcut separat pentru fiecare persoană, iar mîncarea preparată se consuma integral la aceeași masă. Atît pentru băut, cît și pentru prepararea meniului s-a întrebuințat numai apă distilată. O parte din legume și fructele erau consumate în stare crudă.

Pentru ajustarea valorii calorice a meniului la nivelul cheltuielii de energie se măsura consumul de oxigen (metoda Douglas-Haldane), de mai multe ori, atît în perioada preliminară de muncă în laborator, cît și în tot cursul perioadei de activitate musculară. Majorînd cheltuiala de energie din 24 de ore cu 10% (echivalentul caloric mediu al pierderilor digestive pentru un regim mixt), se obținea valoarea calorică a dietei ingerate, și suficiența ei s-a verificat prin controlul zilnic al greutății corporale și prin satisfacerea senzației de saţietate. Ridicarea aportului de calorii la nivelul cheltuielii de energie din cursul perioadei de activitate musculară s-a realizat prin suplimentarea dietei cu produse zaharoase.

Activitatea preliminară de tip sedentar a constat din citit, scris și diverse lucrări de laborator, iar cea musculară s-a efectuat la cicloergometru, fiind alcătuită din 6 reprize de cîte 20 min de efort, separate prin pauze de cîte 1/2 oră. După cum se observă din datele consemnate în tabela nr. 1, intensitatea efortului a variat de la un subiect la altul de obicei între 7 și 10 Cal/min (în medie 8,70), cu 400 pînă la 844 kgm pe minut, iar cantitatea de travaliu exterior produs a fost cuprinsă între 72 000 și 115 000 kgm pe zi (în medie 85 500). După 12 zile de muncă sedentară (în medie 2 600 Cal pe 24 de ore), începea perioada de activitate musculară, a cărei durată a fost de 4 și mai ales de 8 sau 20 de zile, cheltuiala medie de energie fiind de circa 3 500 Cal/24 de ore. Cînd perioada de efort a durat numai 4 zile, s-a repetat același ciclu experimental spre a vedea dacă modificările în eliminarea calciului sînt reproductibile. Fiecare observație se încheia cu 4 zile de muncă sedentară.

În tot cursul observațiilor se recoltau și măsurau materiile fecale și urina din 24 de ore. Marcarea scaunului la trecerea dintr-o formă de activitate la alta s-a făcut prin administrarea de cărbune. Pentru recoltarea sudorii s-a ales un procedeu care, pe de o parte, să prevină creșterea concentrației calciului prin evaporare, iar pe de altă parte să nu jeneze nici desfășurarea normală a activității musculare și nici termoliza. În acest scop s-au confecționat manșoane de polietilenă (10—20 cm lungime), prevăzute la capete cu cordoane elastice. Aplicînd cîte un asemenea manșon pe torace, brațe și coapse, în cursul reprizelor de efort s-au putut recolta, la adăpost de aer, eșantioane de cîte 20—30 ml de sudoare. Înainte de aplicarea manșoanelor, pielea era spălată mai întîi cu apă de conductă și săpun, apoi cu apă distilată și uscată cu tifon sau cu un prosop curat.

Volumul de sudoare s-a aflat prin studiul bilanțului ponderal, cîntărind subiectul dezbrăcat atît la începutul, cît și la sfîrșitul zilei de lucru și măsurînd atît „aportul" (A), reprezentat prin apă, alimente și oxigen, cît și „eliminările" (E), alcătuite din urină, fecale și bioxid de carbon. Ținînd seama de ceea ce a intrat și ceea ce a ieșit din corp, prin aflarea diferenței dintre greutatea inițială (G_1) și cea finală (G_2), s-a obținut apa eliminată extrarenal. Cunoscînd ventilația pulmonară și umiditatea aerului inspirat, s-a aflat apa pierdută pe cale respiratorie, iar prin scăderea acesteia din apa extrarenală s-a obținut cantitatea de sudoare [4]:

$$\text{Apă extrarenală} = G_1 + (A - E) - G_2$$

Sudoarea (grame) = apa extrarenală — apa respiratorie.

Tabela nr. 1

Cheltuiala de energie și travaliul exterior produs în perioadele de muncă sedentară și de activitate musculară

Observația				Cheltuiala de energie			Travaliul exterior în perioada de activitate musculară	
Nr.	Nume	Vîrstă (ani)	Greutate kg	În muncă sedentară Cal/24 h	În perioada de efort		kgm/min	kgm/zi
					Cal/min	Cal/24 h		
I	H.D.	27	66,6	2 364	4,76	3 361	397	75 514
II	H.D.	27	66,6	2 364	6,87	3 895	430	77 936
III	N.C.	28	62,3	2 360	7,96	3 278	650	77 756
IV	D.H.	24	75,0	2 364	7,30	3 214	643	111 652
V	A.R.	23	60,0	2 324	7,14	3 154	607	109 247
VI	V.C.	25	77,0	2 894	8,35	3 770	628	112 970
VII	V.C.	25	77,0	3 168	9,57	4 273	629	113 281
VIII	N.C.	24	66,0	2 300	12,00	3 383	844	101 280
IX	S.M.	23	76,0	2 583	10,16	3 430	844	101 280
X	M.B.	23	70,0	2 376	9,00	3 258	628	75 360
XI	C.P.	25	60,0	2 462	8,53	3 280	628	75 360
XII	V.L.	23	70,0	2 794	9,10	3 653	633	75 960
XIII	G.R.	24	74,0	2 736	9,83	3 687	633	75 960
XIV	R.M.	23	68,3	2 515	9,14	3 402	628	75 360
XV	G.T.	28	63,0	2 349	9,20	3 257	628	75 350
XVI	C.C.	23	60,0	2 491	7,46	3 179	628	75 360
XVII	N.B.	24	69,0	2 716	9,23	3 405	670	80 400
XVIII	I.B.	23	66,5	2 660	9,23	3 382	670	80 400
XIX	C.P.	22	69,0	2 462	9,78	3 430	603	72 360
XX	A.P.	23	69,0	2 851	10,59	3 883	603	72 360
XXI	C.C.	23	60,0	2 851	8,02	3 575	675	81 000
XXII	L.G.	23	61,0	3 009	8,40	3 765	675	81 000
Media		24	67,5	2 590	8,71	3 496	635	85 506

Din cauza variațiilor în cantitatea de fecale și mai ales în ritmul de eliminare a lor, bilanțul s-a determinat pe cîte două zile. Dozarea calciului s-a făcut volumetric (manganometric), după precipitare ca oxalat, direct în urină și sudoare, iar pentru alimente și fecale după o prealabilă calcinare (în cenușă).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Deși rația de 0,8 g pe zi este considerată ca optimă pentru adulți și la aceeași persoană atît aportul, cît și condițiile de absorbție s-au menținut constante, totuși bilanțul acestui element a prezentat oscilații destul de mari în perioada de muncă sedentară, iar la 4 din 20 de persoane (22 de experiențe) a fost negativ. În vederea atenuării acestor variații și pentru concentrarea datelor s-au calculat valorile medii pe cîte 4 zile în ambele forme de activitate. Datorită deosebirilor interindividuale, la interpretarea rezultatelor obținute a fost necesar ca fiecare observație să fie judecată separat, iar prelucrarea lor statistică s-a făcut prin metoda seriei de perechi.

Pentru a vedea frecvența modificărilor de același sens, în tabela nr. 2 se prezintă valorile din ultimele 4 zile de muncă sedentară și cele din

Tabela nr. 2

Bilanțul calciului în ultimele 4 zile de muncă sedentară și în primele 4 zile de activitate musculară

Obs. nr.	În ultimele 4 zile de muncă sedentară					În primele 4 zile cu cîte 6 ore de activitate musculară						Diferența dintre bilanțuri (11—5)
	Ingesta	Excreta			Bilanț	Ingesta	Excreta				Bilanț	
		Fecale	Urină	Total			Fecale	Urină	Sudoare	Total		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	950	551	177	728	222	927	562	314	33	909	+ 18	−204
II	924	572	275	847	+ 77	900	748	255	69	1 072	−172	−249
III	880	652	156	808	+ 72	893	705	195	24	924	− 31	−103
IV	859	798	177	975	−116	872	802	197	48	1 047	−175	−* 59
V	818	700	176	876	− 58	852	1 032	167	53	1 252	−400	−342
VI	770	343	298	641	+129	868	609	301	31	941	− 73	−202
VII	773	448	209	657	+116	826	525	223	32	780	+ 46	− 70
VIII	774	596	183	779	− 5	795	683	186	17	886	− 91	− 86
IX	801	741	213	954	−153	843	965	251	18	1 234	−391	−238
X	954	469	228	697	+257	985	660	281	28	969	+ 16	−241
XI	929	360	248	608	+321	975	447	259	24	730	+245	− 76
XII	902	500	127	627	+275	920	575	148	49	772	+148	−127
XIII	873	659	42	701	+172	894	810	42	44	896	− 2	−174
XIV	753	312	297	609	+144	818	375	332	33	740	+ 78	− 66
XV	743	356	237	593	+150	806	574	227	30	831	− 25	−175
XVI	731	333	309	642	+ 89	742	297	384	27	708	+ 34	− 55
XVII	715	621	103	724	− 9	759	690	113	28	831	− 72	− 63
XVIII	742	677	184	861	−119	763	694	219	22	935	−172	− 53
XIX	679	458	162	620	+ 59	704	589	210	59	858	−154	−213
XX	679	502	107	609	+ 70	704	733	112	39	884	−180	−250
XXI	694	371	236	607	+ 87	730	624	226	34	884	−154	−241
XXII	708	445	237	682	+ 26	724	487	261	63	811	− 87	−113
Media	802,3	521,0	199,1	720,2	+ 82,1	831,8	644,8	222,8	36,6	904,2	− 72,4	−154,5
E.S.	± 19,5	± 30,9	± 14,5	± 25,3	± 27,1	± 18,1	± 36,8	± 16,7	± 3,1	± 31,1	± 32,5	± 18,2

p (între 5 și 11) $< 0{,}001$; p (între 4 și 10) $< 0{,}001$; p (între 2 și 7) $< 0{,}001$; p (între 3 și 8) $< 0{,}01$

Tabela

Bilanțul calciului în ultimele 4 zile de muncă sedentară

Obs. nr.	Perioada de muncă sedentară					Perioada cu cîte 6 ore de					
	Ultimele 4 zile					Zilele 1—4					
	Ingesta	Excreta			Bilanț	Ingesta	Excreta				Bilanț
		Fecale	Urină	Total			Fecale	Urină	Sudoare	Total	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIII	774	596	183	779	− 5	795	683	186	17	886	− 91
IX	801	741	213	954	−153	843	965	251	18	1 234	−391
X	954	469	228	697	+257	985	660	281	28	969	+ 16
XI	929	360	248	608	+321	975	447	259	24	730	+245
XII	902	500	127	627	+275	920	575	148	49	772	+148
XIII	873	659	42	701	+172	894	810	42	44	896	− 2
XIV	753	312	297	609	+144	818	375	332	33	740	+ 78
XV	743	356	237	593	+150	806	574	227	30	831	− 25
XVI	731	333	309	642	+ 89	742	297	384	27	708	+ 34
XVII	715	621	103	724	− 9	759	690	113	28	831	− 72
XVIII	742	676	184	861	−119	763	694	219	22	935	−172
XIX	679	458	162	620	+ 59	704	589	210	59	858	−154
XX	679	502	107	609	+ 70	704	733	112	39	884	−180
XXI	694	371	236	607	+ 87	730	624	226	34	884	−154
XXII	708	445	237	682	+ 26	724	487	261	63	811	− 87
Media	778,4	493,3	194,2	687,5	+ 90,9	810,8	613,5	216,7	34,3	864,5	− 53,7
E.S.	± 23,8	± 35,9	± 20,8	± 27,2	± 36,4	± 24,4	± 43,6	± 24,6	± 3,6	± 32,8	± 39,6

p (între 6 și 12) $< 0{,}001$; p (între 6 și 18) $< 0{,}001$; p (între 3 și 8) $< 0{,}01$; p (între 3 și 14) 5 și 17) $< 0{,}001$.

primele 4 zile de efort muscular. Comparînd aceste valori, se constată că, *indiferent de situația bilanțului în perioada anteefort, munca fizică a mărit eliminările de calciu la toate persoanele (20), iar în 14 din 22 de experiențe pierderile au depășit ingesta.* Pe cînd în ultimele 4 zile de muncă sedentară valoarea medie a bilanțului în 22 de experiențe a fost de + 82 ± 27 mg, în primele 4 zile de activitate musculară ea a scăzut la − 72 ± 32, iar deosebirea dintre cele două valori medii este foarte semnificativă ($p < 0{,}001$). După cum arată valorile din tabela nr. 3, în următoarele 4 zile (5—8) de activitate musculară, eliminările de calciu au continuat să fie mai mari decît în perioada anteefort, iar în 7 din 15 experiențe bilanțul s-a menținut negativ (față de 9 din 15 în primele 4 zile de efort fizic).

Intensitatea pierderilor de calciu după trecerea de la munca sedentară la activitatea musculară s-a realizat mai ales prin cantitatea eliminată în fecale, care în primele 4 zile de efort fizic a crescut cu 24 % (de la 521 ± 31 la 645 ± 37 mg), iar diferența dintre valorile medii este statistic tot atît de semnificativă ca și deosebirea dintre valorile medii ale bilanțului ($p < 0{,}001$). În următoarele 4 zile de muncă fizică, deși valoarea medie a bilanțului se menține foarte semnificativ mai scăzută decît în perioada anteefort ($p < 0{,}001$), totuși creșterea cantității de calciu eliminate cu fecalele este mai puțin importantă ($p < 0{,}01$). La accentuarea eliminării

nr. 3

și în primele 8 zile de activitate musculară

activitate musculară pe zi								
Zilele 5—8								
Ingesta	Excreta				Bilanț	Dif. dintre 6 și 12	Dif. dintre 6 și 18	Dif. dintre 12 și 18
	Fecale	Urină	Sudoare	Total				
13	14	15	16	17	18	19	20	21
820	582	180	14	776	+ 44	— 86	+ 49	+135
929	664	397	15	1 076	—147	—238	+ 6	+244
966	640	333	15	988	— 22	—241	—279	— 38
996	518	309	16	843	+153	— 76	—168	— 92
925	645	229	46	920	+ 5	—127	—270	—143
920	938	64	52	1 054	—134	—174	—306	—132
812	432	295	30	757	+ 55	— 66	— 89	— 23
797	441	432	24	807	— 10	—175	—160	+ 15
728	293	377	22	692	+ 36	— 55	— 53	+ 2
763	786	144	31	961	—198	— 63	—189	—126
773	729	208	21	958	—185	— 53	— 66	— 13
704	538	239	46	823	—119	—213	—178	+ 35
704	569	145	40	754	— 50	—250	—120	+130
722	473	217	24	714	+ 8	—241	— 79	+162
715	380	225	43	648	+ 67	—113	+ 41	+154
818,3	575,2	246,9	29,3	851,4	— 33,1	—144,6	—124,0	+ 20,6
± 26,4	± 42,9	± 24,3	± 3,3	± 33,6	± 26,5	±19,9	± 28,7	± 33,5

$< 0{,}01$; p (între 4 și 9) $< 0{,}001$; p (între 4 și 15) $< 0{,}003$; p (între 5 și 11) $< 0{,}001$; p (între

de calciu în fecale s-a adăugat pierderea acestui element prin transpirație, iar în circa jumătate din experiențe s-a produs o ușoară creștere a calciuriei, făcînd ca diferența dintre cele două perioade să prezinte o siguranță statistică mai mare de 99 % ($p < 0{,}01$). Concentrația calciului în sudoarea corect recoltată de pe corp (evitînd evaporarea) fiind redusă (2—6 mg %) și cantitatea de sudoare din cursul celor 6 ore de activitate musculară efectuată în condiții confortabile (la 20 ± 2°C) nedepășind 1 500 g, pierderea de calciu prin transpirație a fost mică (17—69 mg). Cînd însă munca se execută la cald și transpirația este abundentă, pierderea de calciu pe această cale se poate ridica la 200—250 mg pe zi [2].

Creșterea cantității de calciu eliminate cu fecalele sub influența activității musculare a fost observată și la animale. În cercetări pe 6 cîini tineri (22 de luni), supuși la un regim al cărui conținut în calciu era de 0,17 g%, s-a constatat că 30 min de alergare cu viteza de 6 km pe oră pe un pod rulant, înclinat cu 15°3, a micșorat distinct semnificativ ($p < 0{,}01$) coeficientul de utilizare digestivă a acestui element [8]. Întrucît se știe că hipertiroidia mărește eliminarea de calciu și în experiențe pe 4 viței (de 4—10 săptămîni) s-a constatat că administrarea (intravenos) a 0,1 mg tiroxină pe kilocorp a micșorat retenția acestui element [9], s-ar putea admite că accentuarea pierderilor de calciu se datorește intensificării

metabolismului energetic. Dat fiind că intestinul reprezintă principala cale de eliminare a calciului din organism, este posibil ca creșterea cantității pierdute cu fecalele să fie consecința mobilizării acestui element din trabeculele osoase.

Observînd constanța creșterii eliminărilor de calciu și frecvența negativării bilanțului în cursul celor 4 sau 8 zile cu activitate musculară, ne-am întrebat dacă ruperea echilibrului dintre ingesta și excreta se datorește insuficienței rației (0,8 g pe zi), sau este consecința modificărilor psihoneurohormonale ce se petrec în cursul unui efort fizic, care din punct de vedere metabolic ar putea fi privit ca un factor de încordare („stress"). Această întrebare ni s-a părut cu atît mai îndreptățită cu cît, în cercetări pe cîine, s-a constatat că administrarea de corticosteroizi mărește eliminarea în fecale a radiocalciului (Ca^{47}) injectat intravenos [1]. Pentru a afla răspunsul, la 4 persoane care au efectuat 8 zile de muncă fizică, cu o rație de 0,9 g de calciu pe zi, s-a ridicat aportul la circa 2 g și apoi s-a repetat aceeași perioadă de activitate musculară, iar alte două persoane (obs. XXIII și XXIV) au executat aceeași muncă fizică, primind în prima perioadă, de 8 zile, cîte 1 273 mg de calciu pe zi, iar în a doua numai 787 mg (rația obișnuită).

Tabela nr. 4

Influența mărimii aportului de calciu asupra bilanțului său în cursul activității musculare

Obs. nr.	Bilanțul calciului (mg)							
	Cu rația considerată ca optimă				Cu rație mărită			
	Ingesta (mg)	În muncă sedentară	În perioada de activitate musculară		Ingesta (mg)	În muncă sedentară	În perioada de activitate musculară	
		ultimele 4 zile	zilele			ultimele 4 zile	zilele	
			1—4	5—8			1—4	5—8
X	968	+257	+ 16	— 22	2 028	+419	+305	+364
XI	967	+321	+245	+153	2 041	+535	+662	+614
XII	916	+275	+148	+ 5	1 959	+552	+351	+190
XIII	872	+172	— 2	—134	1 949	+269	+350	+238
Media	931	+256,2	+101,7	+ 0,5	1 994	+443,7	+417,0	+351,5
XXIII	787	—311	—467	—590	1 273	+214	+234	+168
XXIV	787	—349	—164	—540	1 273	+334	+358	+ 37

După cum arată datele din tabela nr. 4, *ridicarea aportului de calciu la circa 2 g pe zi aproape a dublat cantitatea reținută zilnic în perioada de muncă sedentară, iar în perioada de activitate musculară a împiedicat negativarea bilanțului la toate persoanele și a permis ca ea să se desfășoare cu importante retenții ale acestui element.* Trecerea de la rația de 1 273 mg la 787 mg pe zi a fost însoțită de negativarea bilanțului chiar în perioada de muncă sedentară, iar negativarea s-a accentuat în perioada de activitate musculară. Rezultatele acestor experiențe ne-au arătat că majorarea aportului de calciu la cel puțin 1,2 pînă la 1,3 g pe zi permite organismului

să execute un efort muscular intens fără negativarea bilanțului. Faptul că multe persoane care practică profesiuni cu mare cheltuială de energie, deși primesc prin dieta lor chiar mai puțin ca 10—12 mg de calciu/kilocorp (0,7—0,8 g pe zi), totuși nu se demineralizează (cum ar fi de așteptat dacă pierderea acestui element ar fi continuă), ne-a determinat să vedem dacă la accentuarea pierderilor de calciu nu au concurat și reacțiile neurohormonale determinate de activitatea musculară. Bazîndu-ne pe faptul binecunoscut că reacțiile organismului față de un factor se micșorează pe măsură ce acțiunea acestuia se repetă, am cercetat *efectul adaptării la efort și la dietă asupra bilanțului în calciu*. În acest scop, 7 persoane au continuat aceeași activitate musculară zilnică timp de 3 săptămîni fără întrerupere, aportul de calciu fiind de 0,72 g pe zi.

Tabela nr. 5

Efectul adaptării la efort asupra bilanțului în calciu

Obs. nr.	Bilanțul calciului (media zilnică în mg pe grupe de cîte 4 zile)							
	Ingesta	Repaus		Perioada de efort				
		zilele		zilele				
		5 — 8	9—12	1—4	5—8	9—12	13—16	17—20
XVI	719	+94	+ 89	+ 34	+ 36	— 74	— 69	+116
XVII	757	— 4	— 9	— 72	—198	—173	—233	— 46
XVIII	763	—33	—119	—172	—185	—339	—201	—174
XIX	694	+74	+ 59	—154	—119	— 25	— 45	—210
XX	694	+40	+ 70	+180	— 50	— 13	— 12	— 1
XXI	701	+75	+ 87	—154	+ 8	+ 62	+ 39	— 68
XXII	703	+ 5	+ 26	— 87	+ 67	— 6	—195	+ 30
Media	719	+35,8	+ 29,0	—112,1	— 63,0	— 81,1	—102,2	— 50,4

După cum rezultă din datele consemnate în tabela nr. 5, pierderile de calciu au depășit ingesta în tot cursul perioadei de muncă fizică, bilanțul fiind aproape constant negativ, însă la unele persoane se observă, în ultima parte a acestei perioade, o tendință de micșorare a pierderilor. În cercetări asupra nevoii de proteine [5], am constatat că, după două săptămîni de repetare a aceleiași activități musculare, cu rația de 1 g pe kilocorp, din negativ, bilanțul azotului se apropie de echilibru. Este posibil ca pentru calciu perioada de adaptare la mărimea aportului să fie mai lungă decît pentru proteine, sau ca efectul modificărilor hormonale determinate de efort („stress") asupra metabolismului calcic să fie mai persistent.

Rezultatele cercetărilor noastre prezintă interes atît teoretic, cît și practic. Pe plan teoretic, ele arată că intensificarea metabolismului în cursul activității musculare interesează chiar și componente care par imobilizate (fixe) și nu participă direct la furnizarea energiei de contracție, ceea ce demonstrează că relațiile dintre diferitele trofine sînt mult mai cuprinzătoare decît se crede. Din punct de vedere practic, intensificarea pierderilor de calciu pînă la negativarea bilanțului și posibilitatea prevenirii

acesteia prin creșterea aportului ridică problema majorării rației persoanelor care desfășoară o activitate musculară intensă la minimum 1—2 g în 24 de ore. Deși concentrația calciului în sudoare este redusă (2—6 mg %), totuși nesocotirea acestei pierderi micșorează considerabil valoarea științifică a determinărilor de bilanț, mai ales cînd persoanele în observație transpiră abundent.

CONCLUZII

1. Activitatea musculară a mărit eliminările de calciu la toate persoanele, iar în 14 din 22 de experiențe pierderile au depășit cantitatea ingerată, diferența dintre valoarea medie a bilanțului înainte ($+ 82 \pm \pm 27$ mg) și după începerea efortului ($- 72 \pm 32$ mg) fiind statistic semnificativă ($p < 0{,}001$). Intensificarea pierderilor de calciu în cursul activității musculare s-a realizat prin cantitatea eliminată în fecale, care a crescut cu 24 % ($p < 0{,}001$), la care s-a adăugat pierderea prin transpirație și prin hipercalciurie statistic semnificativă ($p < 0{,}01$).

2. La 7 persoane, prin repetarea aceleiași activități musculare zilnice, timp de 3 săptămîni, rația de calciu și condițiile de absorbție rămînînd constante, pierderile acestui element nu au scăzut semnificativ, și bilanțul a rămas aproape constant negativ, însă în ultima parte a acestei perioade de adaptare (la efort și la aport) s-a observat o tendință la micșorarea pierderilor.

3. Ridicarea aportului de calciu la circa 2,0 g sau chiar la 1,3 g pe zi a împiedicat negativarea bilanțului în 8 zile de activitate musculară la toate persoanele [6] și a permis ca efortul fizic să se desfășoare cu retenția acestui element în cantități importante.

Rezultatele obținute demonstrează că intensificarea metabolismului general în cursul activității musculare interesează și componente care nu participă direct la furnizarea energiei de contracție, ceea ce, pe de o parte, ridică problema majorării rației de calciu a persoanelor ce desfășoară activitate musculară intensă la circa 1,2 g, iar pe de altă parte nesocotirea pierderilor cu sudoarea micșorează considerabil valoarea științifică a determinărilor de bilanț la persoane care transpiră abundent.

Prezentată la redacție
la 30 decembrie 1964

Catedra de alimentație,
I.M.F.-București

BIBLIOGRAFIE

1. Collins E. J., E. R. Garrett, R. L. Johnston, *Effect of Adrenal Steroids on Radio-calcium Metabolism in dogs*, Metabolism, **11**. 716 (1962).
2. Consolazio C. F., L. O. Matoush, R. A. Nelson, L. R. Hackler, E. E. Preston, *Relationship between calcium in sweat, calcium-balance and calcium requirements*, J. Nutr., **78**, 78 (1962).

3. Gontzea I., H. Dumitrescu, P. Schutzescu, *Cercetări referitoare la influența efortului fizic asupra bilanțului fosforat la om*, Fiziol. norm. și patol., **4**, 425 (1958).
4. Gontzea I., P. Schutzescu, *Cercetări asupra pierderii de azot prin transpirație*, St. cerc. biochim., **6**, 215 (1963).
5. Gontzea I., P. Schutzescu, S. Dumitrache, *a) Influența efortului fizic asupra bilanțului azotat*, Igiena, **8**, 297 (1959); b) *Untersuchungen über den Proteinbedarf des Menschen bei körperlicher Arbeit in heisser Umgebung*, Int. Zschr. angew. Physiol., **18**, 248 (1960).
6. Gontzea I., P. Schutzescu, F. Jantea, *Concentrația azotului total din sudoare*, Igiena, **8**, 249 (1959).
7. Gontzea I., P. Schutzescu, A. Rujinski, S. Dumitrache, *Influența activității musculare asupra bilanțului calcic*, Fiziol. norm. și patol., **9**, 147 (1963).
8. Konishi F., J. McCay, *The effect of exercise on nutrient utilization with special reference to calcium*, J. Nutr., **71**, 125 (1960).
9. Meyer H., P. Schmidt, *Der Einfluss von Thyroxin auf den Magnesium und Kalziumstoffwechsel beim Kalb*, Dtsche tierärztl. Wschr, **65**, 602 (1958).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 427–440 (1965)

CONSTITUENȚI ANTIGENICI PROPRII ȘI DE ORIGINE SANGUINĂ ÎN BILA HEPATICĂ ȘI VEZICULARĂ UMANĂ
STUDIU IMUNOELECTROFORETIC

N. ST. CHIȘIU

576.8.097–611.018.54

Rezumat. — Prin macroimunoelectroforeză și dublă difuzie în agar, utilizînd ser imun antiser de om și seruri imune antibilă (adsorbite cu ser de om normal în exces), se pun în evidență în bila hepatoveziculară umană 10 constituenți antigenici comuni cu cei ai serului sanguin și 8 constituenți antigenici proprii. Unii dintre aceștia din urmă se detectează și în serul sanguin al ictericilor.

Se discută schimburile posibile între sînge și bilă, condițiile lor și implicațiile patologice posibile, în particular afecțiuni hepatobiliare cu componentă autoimună.

În bila veziculară recoltată *per operator*, Cresti și Dessi [8] separă electroforetic șase fracțiuni proteice corespunzătoare zonelor beta- și gamma-globulinelor din serul sanguin. În bila obținută prin tubaj, Sotgiu și colab. [18] separă cinci fracțiuni, dintre care 4 corespund zonelor albuminelor și, respectiv, beta-și gamma-globulinelor ; a cincea fracțiune — cu migrarea cea mai lentă (notată Y) — nu avea corespondent în serul sanguin.

Verschure (citat după [17]), utilizînd tot electroforeza pe hîrtie, nota prezența a 4 spoturi principale în electroforegrama bilei veziculare umane (P_1, P_2, P_3, P_4), dintre care două (P_1 și P_2) fără corespondent în serul sanguin. Spoturile P_2 și P_3 se situau în zonele albuminelor și alfa$_2$-globulinelor, dar cu mobilitate electroforetică ușor modificată.

Rawson [17], aplicînd metoda imunoelectroforetică, relevă, cu ser imun antiser de om (preparat pe cal sau iepure), prezența în bila umană a serum-albuminelor în zona P_2, două arcuri de precipitare cu mobilitate alfa$_2$ în zona P_3 (la unele probe) și, constant, gamma-globuline. În bila hepatică obține constant arcurile de precipitare corespunzătoare albuminelor și gamma-globulinelor și, uneori, două arcuri adiționale, similare cu siderofilina și alfa$_2$-globulina din ser.

Cantitativ și calitativ, prezența în bila umană a proteinelor sanguine este variabilă, și această variabilitate apare legată de unele stări clinice,

ca icterul hepatic [19], sau litiaza biliară [1]. O astfel de corelaţie a fost dovedită experimental pentru bila veziculară la cobaiul scorbutic [1], fără a se putea arăta unde intervine cauza : la nivelul ficatului sau la nivelul veziculei biliare.

Întrucît gamma-globulinele nu s-ar sintetiza în ficat, Rawson [17] crede că aceste proteine ar ajunge în bilă direct din ser „via perisinusoidal canals", din spaţiul Disse în capiliculul biliar, care, după I. Pavel [12] se deschide aici.

În această lucrare am căutat să identificăm imunologic în bila umană, pe lîngă constituenţii comuni cu cei din serul sanguin, alţi constituenţi antigenici biliari proprii, fără corespondenţi electroforetici în serul sanguin. De asemenea, am urmărit şi eventualul reflux al antigenelor biliare în circulaţia sanguină în unele stări clinice (ictere), ca şi semnificaţia şi cointeresarea lor posibilă în unele boli hepatobiliare autoimune.

Prezentăm şi unele date experimentale care pot ajuta la înţelegerea modului în care ajung în bilă constituenţii antigenici ai serului sanguin.

MATERIAL ŞI METODĂ

Identificarea antigenelor specifice bilei s-a făcut cu ser de iepure, imunizat antibilă hepatoveziculară umană.

Pentru punerea în evidenţă a antigenelor de origine sanguină din bilă s-a utilizat un ser imun de cal antiser de om, care conţinea anticorpi faţă de 18 componente ale serului sanguin [5].

Pentru depistarea antigenelor presupuse proprii şi specifice bilei s-au utilizat serurile de iepure antibilă umană, notate H_1 şi H_2 (1962—1963) şi 507, 509, 510 şi 535 (1963—1965).

Pentru obţinerea acestor seruri s-au făcut inoculări repetate (serii de cîte 3 injecţii la interval de 14 zile — pauză 2—3 luni —, apoi o nouă serie similară) dintr-un amestec de bilă hepatică, bilă veziculară şi adjuvant Freund complet (1+1+1 ml), timp de 1—2 ani. Mostrele de bilă — obţinute fie *per operator*, fie la necropsie — au fost selecţionate, pentru amestecurile de injectat, după criteriul bogăţiei lor în componentele biliare descrise de Verschure. Pentru aceasta, s-a făcut fiecărei mostre în prealabil electroforeza în agar (soluţie 1% în tampon veronal — veronal sodic pH 8,6, forţa ionică 0,05). În figura 1 se prezintă electroforegrame din mostrele utilizate ca antigen pentru obţinerea serurilor antibilă.

Fiecare mostră de bilă a fost utilizată în forma ei nativă, păstrată la +4 °C atît în amestecul de injectat, cît şi pentru electroforeză. Pentru inoculare s-a făcut în prealabil asepti-zarea prin expunere 20 min la raze ultraviolete, cu control pe mediul de cultură, apoi s-a înglobat în amestec şi un antibiotic (de obicei streptomicină).

Dintre mostrele de bilă veziculară cercetate, una provenea de la un nou-născut, 16 de la persoane mature de diverse vîrste (2 cu litiază veziculară, 14 fără litiază, prelevări necroptice) şi 10 din colecistectomii (ictere mecanice).

Recoltarea serurilor imune s-a făcut la 10 zile după ultima inoculare atît pentru control cît şi pentru cercetare.

Serurile imune au fost utilizate în imunoelectroforeză (macroelectroforeză, lame 5 × 16 cm, agar şi tamponul indicat mai sus) ori pentru dublă difuziune Ouchterlony fie ca atare, fie după absorbţie cu ser sanguin de la om normal (niciodată cu seruri icterice).

[1] N. Chişiu, 1964, date nepublicate.

S-a folosit un aparat de electroforeză cu răcire prin curent continuu de apă, 1,5 mA/cm, timp de 4—5 ore.

După aplicarea serurilor imune, lamele au fost păstrate în termostat (+37 °C) timp de 3—7 zile, după care au fost fotografiate ca atare în baie de apă, pe negatoscop cu fond negru. Fotografiile obţinute, confruntate cu lama, au servit la întocmirea diagramelor liniilor de precipitare obţinute.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

A. Antigene biliare comune cu cele din serul sanguin

Cu ser de cal antiser de om, în bila veziculară de la noul născut se developează numai albumina serică şi, probabil, siderofilina (urme) (fig. 2 *a*/1).

În mostre de bilă veziculară de la persoane adulte, acelaşi ser imun arată în plus prezenţa gamma-globulinelor şi a încă două arcuri de precipitare în zona beta$_1$-globulinelor, dintre care una ar putea fi siderofilina. În bila din vezicula litiazică, aceste componente apar în concentraţie mare; ca o precizare în plus notăm că arcul albuminei formează două bucle unite, dintre care una are centrul de difuziune în godeul de start, iar alta păstrează migrarea normală din serul sanguin (identitate antigenică, diversitate de mobilitate electroforetică) (fig. 2 *b*/2).

În bila hepatică (drenaj prin tub T după icter mecanic), serul imun antiser de om pune în evidenţă 8 componente antigenice distincte, dintre care una din zona albuminelor (A), patru în zona alfa- şi beta$_1$-globulinelor şi trei în zona imunoglobulinelor (beta$_2$ şi gamma) (fig. 2 *c*/2).

Trebuie să remarcăm însă că nici unul dintre aceşti componenţi ai bilei veziculare sau hepatice nu are vreun raport electroforetic cu spotul P_1, cantitativ cel mai bine reprezentat în electroforegrama bilei veziculare, deşi componente din acest spot precipită uneori în dubla difuziune cu serul de cal antiser de om. Apreciind însă specificitatea acestor reacţii de precipitare obţinute cu serul de cal antiser de om, facem aici o precizare: serul de cal, fie că este imun, fie că nu, precipită o componentă nedifuzibilă din spotul P_1 (cu pigmenţi) şi alta difuzibilă din acelaşi spot. Precipitarea unei componente nedifuzibile situate în zona spotului cu pigmenţi se observă şi la unele mostre de bilă hepatică la care lipseşte de obicei spotul P_1.

Deoarece prin electroforeză se constată că la serul icteric pigmenţii biliari migrează solidari cu albumina serică, s-ar putea crede că o parte dintre aceste proteine ar fi reţinute şi vehiculate în spotul P_1 de către bilirubină şi ar fi precipitate pe loc de către un exces de anticorpi antialbumină. Controlul făcut arată (fig. 3) că între componentele spotului P_1 din bila veziculară şi proteinele serice nu există nici o corespondenţă antigenică; aceasta reiese din faptul că linia de precipitare ce reprezintă serum albumina, ca şi celelalte linii de precipitare, proprii serului sanguin,

taie toate componentele spotului P_1 aparținînd unei mostre de bilă veziculară.

Din datele ilustrate în figura 2 reiese că spotul P_1, neobișnuit în bila hepatică, poate apărea și în căile biliare superioare (nu numai în rezervorul vezical), în relație probabil cu o stază biliară prelungită, datorită unui obstacol în drenajul biliar. Prezența acestui spot persistă însă la astfel de cazuri în bila hepatică chiar după un drenaj liber de cîteva zile. Ca poziție de migrare electroforetică, el apare variabil, uneori situîndu-se în zona centrului de difuziune a albuminei serice (ca în cazul din fig. 2 *d*/1), altcori apare mai avansat și neomogen (cazul din fig. 2 *c*/2). Componentele acestui spot nu au corespondent în serul sanguin.

Proba identificării antigenelor din bila veziculară cu cele din serul sanguin s-a putut face direct numai pentru albumine și gamma-globuline, așa cum se vede în figura 4, în care imunoelectroforeza bilei a fost combinată pe aceeași lamă cu testul de dublă difuzie a serului sanguin.

Pentru identificarea celorlalte componente din bilă s-a făcut o imunoelectroforeză paralelă de ser sanguin și bilă hepatică (probă bogată în antigene de origine sanguină), supusă migrării un timp mai îndelungat. După aprecierea acesteia, se poate interpreta că alte componente antigenice developate direct în bila hepatică prin ser imun ar mai fi următoarele : 2 alfa$_1$-globuline, 2 alfa$_2$-globuline și 3 beta$_1$-globuline (fig. 5 *a*/2).

Judecînd după poziția arcurilor de precipitare obținute în zona beta$_1$-globulinelor (fig. 5 *b*/1), se pare că ele ar corespunde siderofirinei beta$_{1\,A}$- și beta$_{1\,B}$-globulinelor din serul sanguin.

Coroborînd aceste date cu cele din proba ilustrată în figura 2 *c*/2, în care în zona imunoglobulinelor sînt evidențiate două componente în plus, rezultă că în bila hepatică pot fi prezenți pînă la 10 componenți antigenici comuni cu serul sanguin.

Imunoelectroforeza serului sanguin normal, folosind serul imun antibilă H_1, arată că imunoglobulinele beta$_{2A}$ și beta$_{2M}$ pot apărea în bilă (fig. 6 *a*/1 și *a*/2). Reamintim că imunizarea s-a făcut cu un amestec calitativ variat de bilă hepatică și veziculară, care în timpul recoltărilor nu au fost contaminate niciodată cu sînge.

Serul antibilă 507 mai pune în evidență în plus în serul sanguin, în aceeași zonă a imunoglobulinelor, două arcuri de precipitare, care ar putea fi beta$_{2B}$- și beta$_{2C}$-globuline (fig. 6 *c*/2).

Notăm că acest ser sanguin a fost păstrat mai mult timp la + 4°C și provenea de la un caz cu antecedente — relativ îndepărtate — de hepatită epidemică.

Sub aspectul compoziției chimice a antigenelor din bilă, comune cu cele din serul sanguin, remarcăm că niciodată nu am obținut colorarea cu Sudan negru a vreunui arc de precipitare din bila veziculară sau hepatică. Cu toate acestea, componenta proteică (sau unele determinante antigenice ale acesteia) din lipoproteinele serului sanguin este prezentă în bilă. Aceasta rezultă din reacția de identitate pe care am obținut-o în imunoelectroforeza serului sanguin (fig. 6 *c*) contra serului antiser de om, pe de o parte (*c*/1), și contra serului antibilă, pe de altă parte (*c*/2),

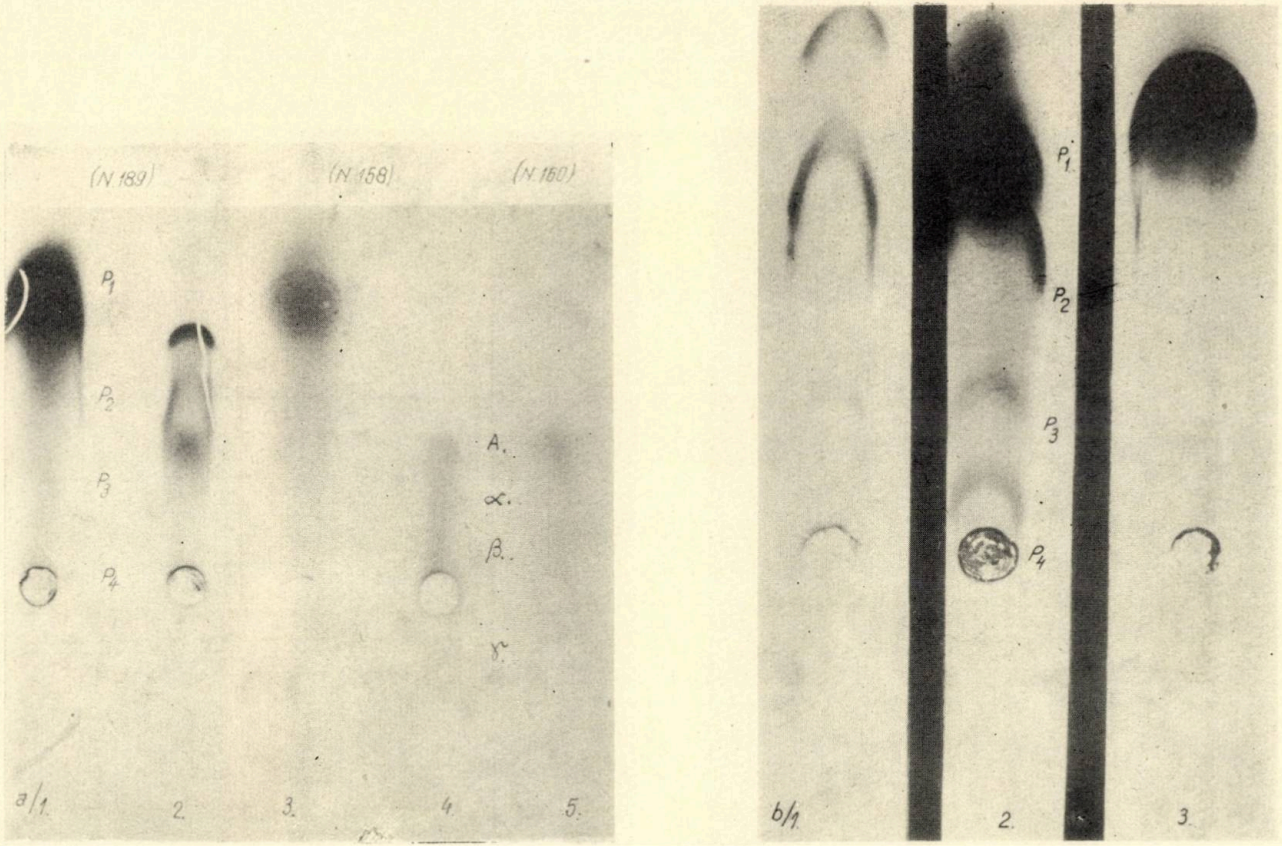
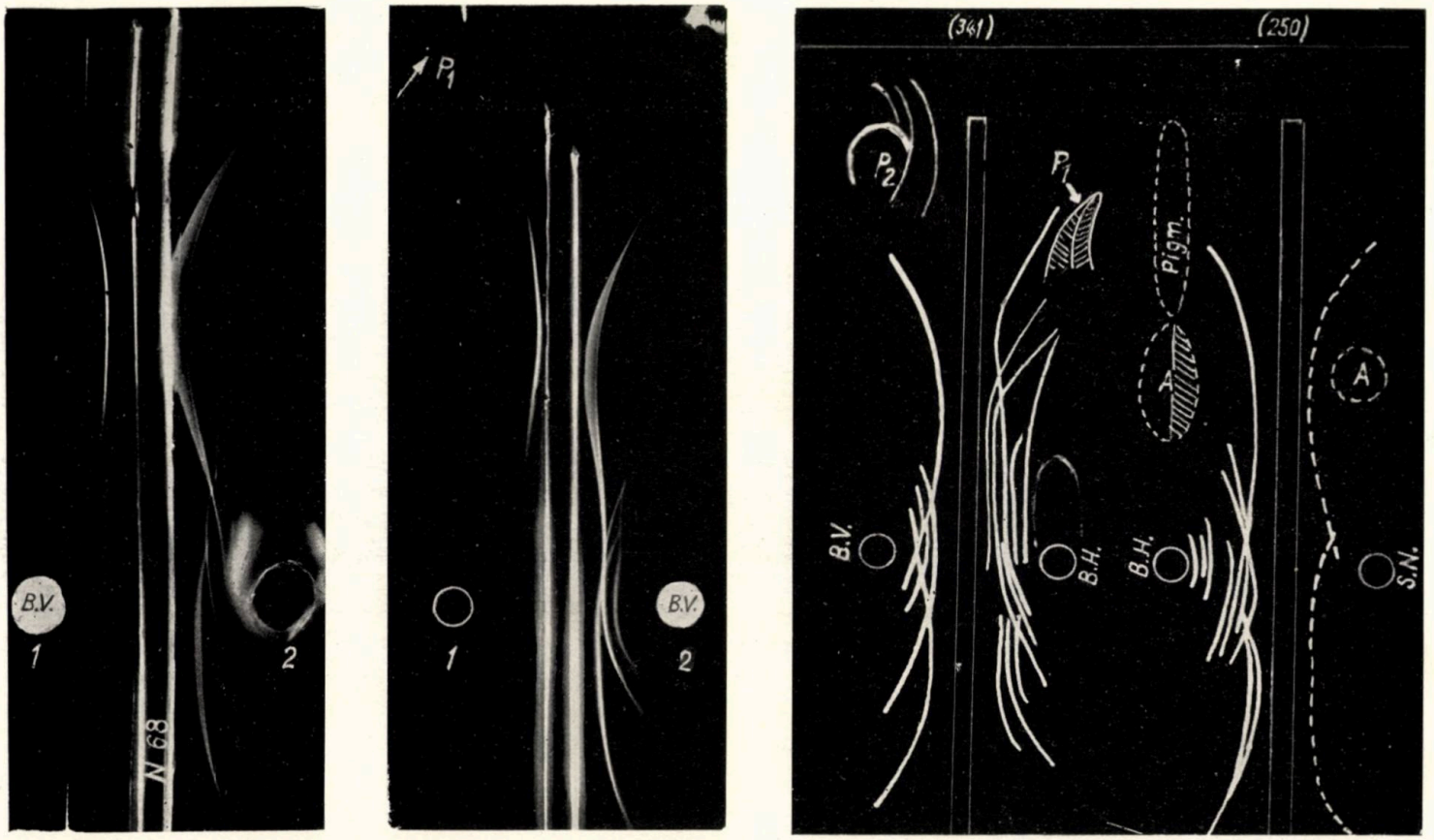


Fig. 1. — Mostre de bilă veziculară şi bilă hepatică umană, utilizate ca antigen pentru obţinerea de seruri imune (inoculare la iepure). *a*) Electroforegrame în agar colorate cu albastru de bromfenol; *1, 2,3* şi *5* = bilă veziculară; *4* = bilă hepatică. *b*) Electroforegrame în agar, colorate cu Sudan negru (bilă veziculară). $P_{1-2-3-4}$ = corespondenţe cu nomenclatura Verschure. *A* (albumina), α, β şi γ (globuline) = corespondenţe cu electroforegrama proteinelor serice.



a/1 a/2 b/1 b/2 c/1 c/2 d/1 d/2

Fig. 2. — Imunoelectroforegrame paralele cu bilă veziculară (*a*/1, *b*/1, *b*/2, *c*/1), bilă hepatică (*c*/2, *d*/1) şi ser sanguin normal (*a*/2, *d*/2), developate cu ser imun de cal antiser sanguin de om. Liniile punctate din *d*/2 arată, comparativ, nivelul albuminelor şi gamma-globulinelor serice faţă de bilă. A din *d*/1 = componentă nedifuzibilă în zonă situată în centrul de difuziune corespunzător albuminelor; Pigm. = treneu de biliverdină.

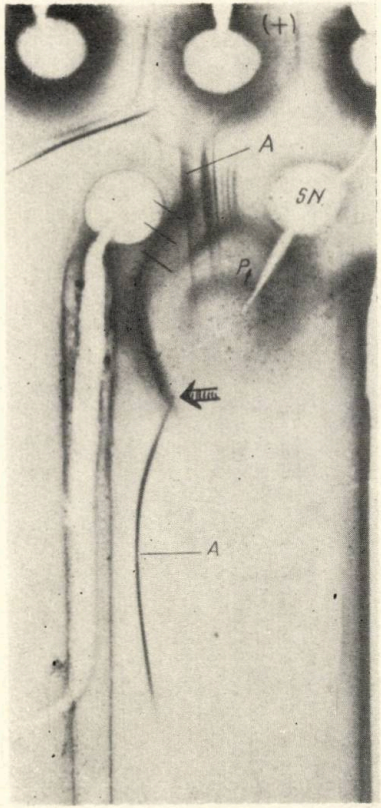


Fig. 3. — Imunoelectroforegramă a bilei veziculare umane faţă de ser imun de cal antiser sanguin om. P_1 = spotul cu pigmenţi P_1 Verschure ; A = albumine serice biliare şi sanguine ; S.N. = = ser sanguin uman. Cele trei săgeţi indică linia de precipitare a albuminelor serice care traversează toate componentele spotului P_1.

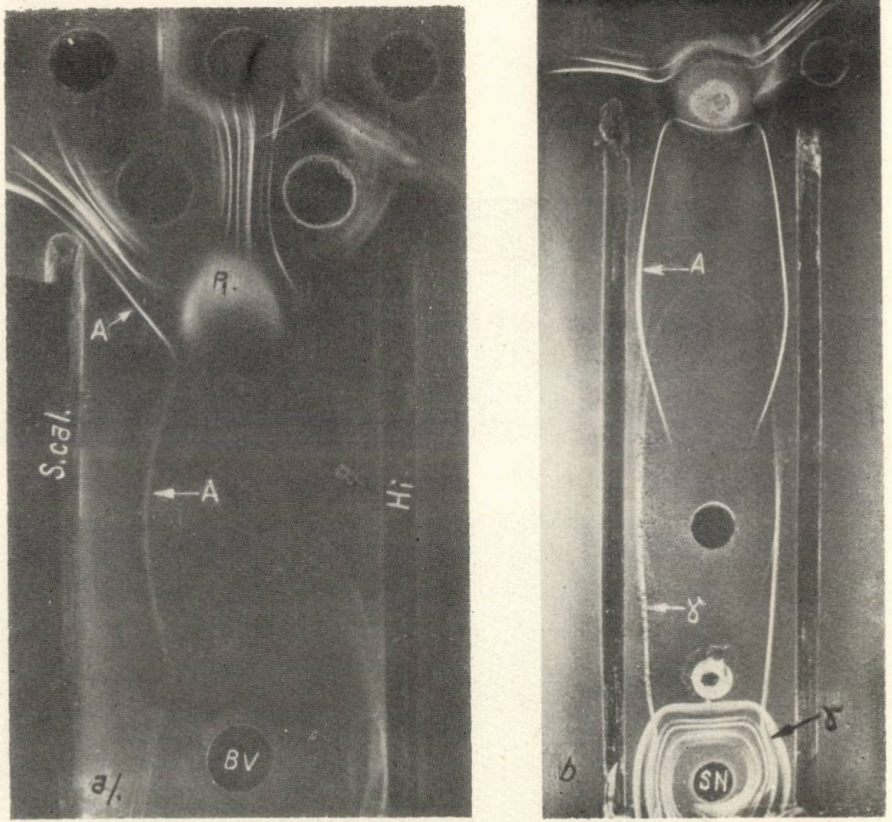


Fig. 4. — Imunoelectroforegrama bilei veziculare. *a*) identitate antigenică între albumina serică şi albumina din bilă. *b*) identitate antigenică a gamma-globulinelor din serul sanguin cu cele din bilă.

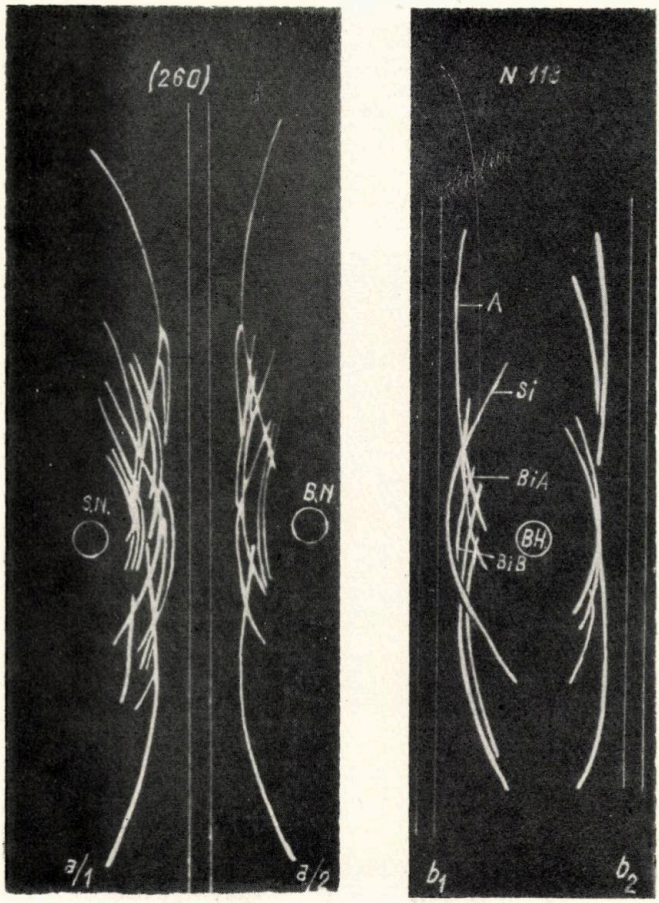


Fig. 5. — Imunoelectroforeză paralelă de ser sanguin (SN în *a*/1) şi bilă hepatică (B.H. în *a*/2) difuzate faţă de ser imun de cal antiser om : 9 arcuri de precipitare în bila hepatică. *b*/1 = = cu acelaşi ser de cal se obţin în bila hepatică (mostra N/118) arcurile de precipitare corespunzătoare siderofilinei (Si), $beta_{1A}$ şi $beta_{1B}$-globulinelor din serul sanguin.

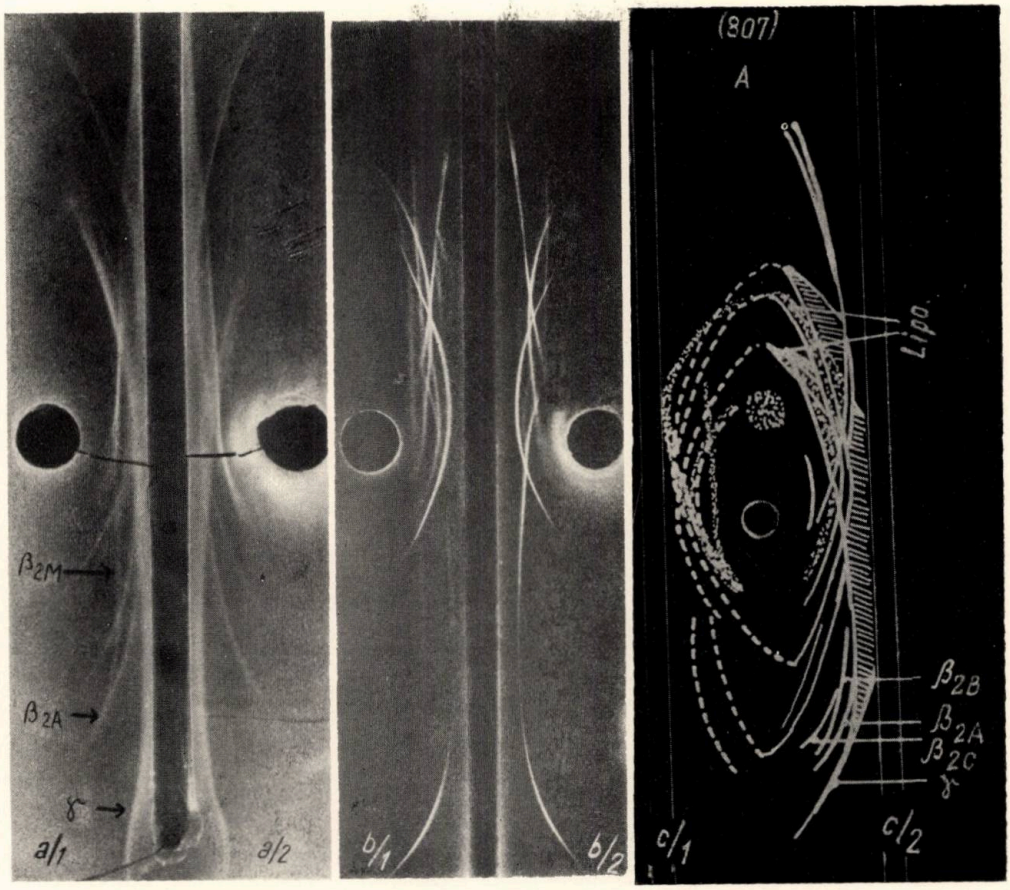


Fig. 6. — Imunoelectroforegrame de seruri sanguine față de ser imun antibilă (*a* și *c*/2) și contra ser imun antiser (*b*, *c*/1). Se pune în evidență în serul antibilă prezența anticorpilor corespunzători la $beta_{2A}$, $beta_{2M}$, $beta_2$ din ser și a doi determinanți antigenici aparținînd lipoproteinelor serice (lipo). Zonă punctată = zonă sudanofilă; zonă hașurată = arc de precipitare abundent; linii întrerupte = arcuri de precipitare comparative (obținute cu ser antiser de om).

unde lipoproteina din $alfa_2$ are anticorpi corespondenţi în serul imun 507. Acest ser imun mai are un anticorp corespondent şi pentru altă proteină din lipoproteinele serice, dar care apare parţial modificată şi nu a putut fi identificată; precipitată cu ser imun, această proteină nu este sudanofilă. Pentru ambii constituenţi lipoproteici relevaţi în sînge de către serul 507, sudanofilia este slabă şi difuză, probabil, datorită titrului mic de anticorpi corespondenţi ori deplasării liniei de întîlnire dintre antigen şi anticorp.

Mai trebuie semnalată aici o deosebire calitativă, dificil de interpretat, între constituenţii spotului electroforetic corespunzător albuminelor din ser şi ai proteinei corespondente (electroforetic şi imunologic) din bilă. Această deosebire nu reiese din precipitarea cu ser imun antiser de om sau antibilă de om, dar este indicată prin precipitare cu o soluţie de hemoglobină (eritrocite hemolizate în apă distilată, reprezentînd de două ori volumul plasmei corespondente). Cu o astfel de soluţie se obţine o lizieră de precipitat nespecific numai în zona spotului de albumină din serul sanguin, nu şi în zona spotului biliar corespunzător albuminei. Dacă albumina serică este responsabilă de acest precipitat, atunci între albumina din ser şi cea din bilă există diferenţe pe care serurile imune nu le arată. Sînt necesare noi studii pentru a putea lămuri această observaţie înainte de a o utiliza la interpretări privind trecerea albuminei din circulaţia sanguină în bilă.

Pentru înţelegerea modului cum antigenele de origine sanguină ajung în bilă, ni se pare foarte important şi faptul că lipoproteina este disociată la un nivel oarecare în ficat sau poate undeva, foarte sus, în canalele biliare. În această disociere şi-ar putea avea originea şi lipidele biliare, care apar altfel fără corespondent antigenic cu serul sanguin. Bila, după cum se ştie, conţine cantităţi importante de lipide, fapt pe care îl ilustrăm şi noi (fig. 1/*b*).

B. Antigene proprii bilei

Cu serurile imune antibilă H_1, H_2, 507 şi 509 ca atare sau absorbite cu ser sanguin normal se detectează în bila hepatică şi veziculară umană 8 constituenţi antigenici proprii.

Cu serul imun H_2 s-au obţinut două arcuri de precipitare corespunzătoare spotului P_1 (I şi II în fig. 7 *a*/1 şi *b*/2), dar care nu au putut fi colorate cu albastru de bromfenol (fig. 3). Serul imun H_1 pune în evidenţă numai unul din antigenele de mai sus, precum şi alte 3 în zona spoturilor P_3 şi P_4 (fig. 7 *c*/2 şi *f*/2, VI, III şi VII).

Serul imun 507, după absorbţie cu ser sanguin normal în exces, indică prezenţa în bila veziculară a antigenelor III, V, VIII şi, probabil, VII, iar în cea hepatică precipită distinct antigenele III, IV, V şi VII.

Evident că aceste observaţii nu se pot generaliza numai pe baza mostrelor de bilă cercetate, fără o susţinere statistică corespunzătoare. Se poate afirma însă că mostrele de bilă utilizate la prepararea serurilor

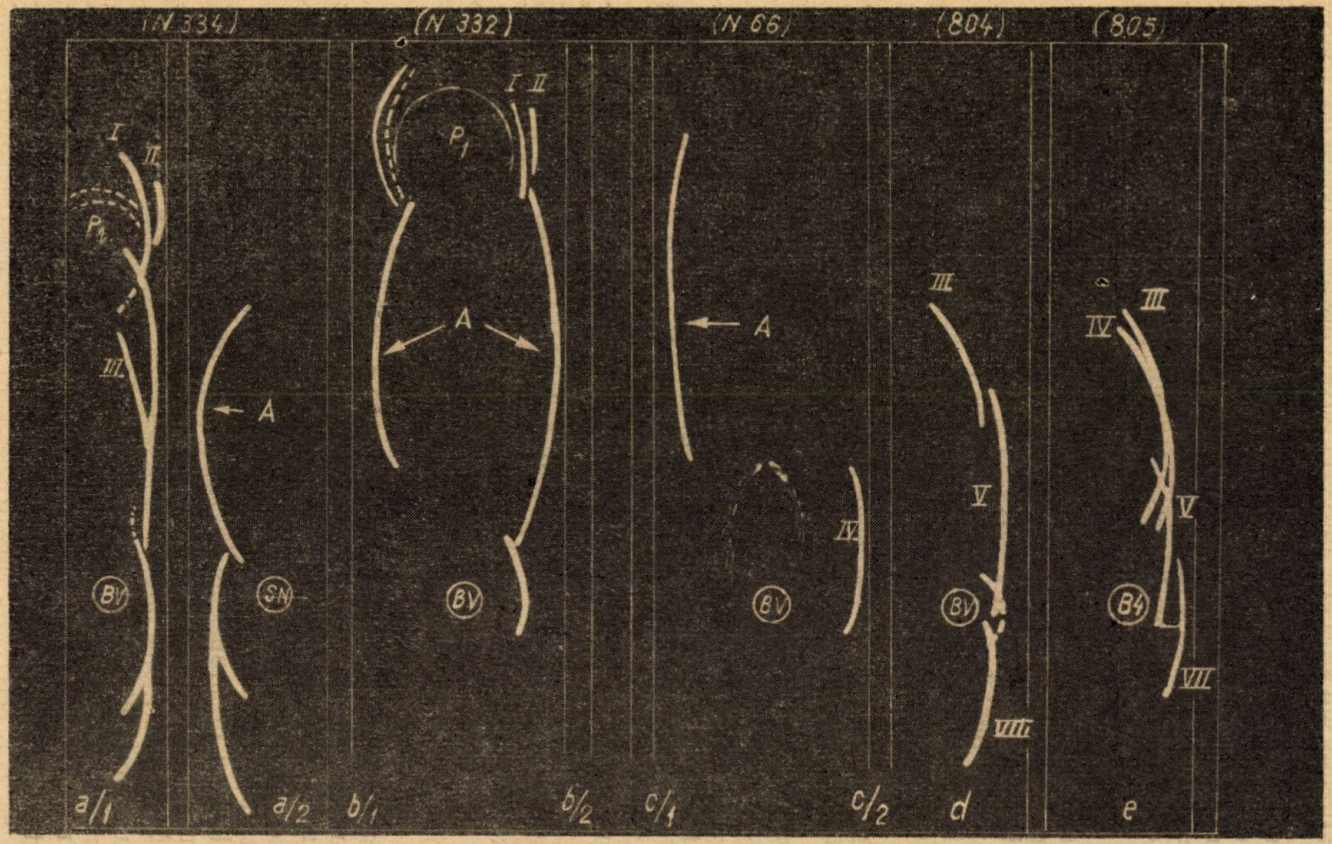


Fig. 7. — Diagrame ale arcurilor de precipitare obținute imunoelectroforetic cu ser imun de cal antiser contra bilă veziculară (*b*/1, *c*/1) și cu ser antibilă contra ser sanguin (*a*/2) și contra bilă veziculară (*a*/1, *b*/2, *c*/2).
Antigene proprii bilei, precipitate imunoelectroforetic în bilă hepatică și veziculară (*d* și *e*), cu ser imun de iepure antibilă, după adsorbție cu ser sanguin normal.
I—VIII = linii de precipitare indicînd poziția electroforetică a antigenelor proprii bilei.

imune (şi parte din cele analizate) conţineau toate aceste antigene o dată ce animalele inoculate au elaborat anticorpi pentru fiecare din ele.

În raport cu spoturile schematice de referinţă $P_{1-2-3-4}$ (Verschure) şi cu constituenţii de origine sanguină — antigenele specifice bilei se situează după cum urmează : antigenele I şi II în zona P_1 (ar fi specifici bilei veziculare?) ; antigenele III şi IV în zona $alfa_1$-globulinelor ; iar V şi VI în zona $alfa_2$-$beta_1$-globulinelor. Componenta VII ar avea centrul de difuziune chiar în godeul de start, iar componenta VIII simulează poziţia imunoglobulinelor din zona $beta_{2B-C}$ sau $beta_{2M}$.

Întrucît numerotarea făcută mai sus, inclusiv echivalenţa de poziţie electroforetică, se bazează pe date obţinute cu seruri diferite, în bile diferite, atît hepatice, cît şi veziculare, normale şi patologice, este posibil ca atît viteza de migrare în cîmpul electric, cît şi difuziunea liberă în agar să nu fi fost identice şi să fi determinat modificări de poziţie ale aceluiaşi antigen de la probă la probă. Ne referim aici la antigenul VI din proba N 66 şi la antigenul V din proba 805 (ambele bile veziculare) cu linii de precipitare situate deasupra godeului de start, dar care diferă prin viteza lor la difuziune în agar (foarte mare la VI şi relativ mică la V). O discuţie similară ar putea fi făcută privitor la antigenul VII în raport, pe de o parte, cu V şi VI, iar pe de altă parte cu VIII. Reţinînd însă, în ultimă analiză, observaţiile făcute cu probele 805 şi 334 (pentru P_1), rezultă că serurile imune H_2 şi 507 pun în evidenţă 6 antigene diferite de cele conţinute şi de serul sanguin.

Diversitatea constituenţilor bilei veziculare nu se limitează numai la datele arătate mai sus. În spotul P_1, de exemplu, în care serurile noastre imune au precipitat doar 2 constituenţi antigenici, difuziunea unei soluţii de hemoglobină umană face să apară aici 6 linii de precipitat distincte [2]. Această experienţă arată că cel puţin pe acest criteriu spotul P_1 are 6 constituenţi distincţi (fig. 8 *a*). Evident însă că distincţia pe care o face precipitarea cu hemoglobine nu arată o specificitate antigenică.

Din datele de mai sus rezultă că structura antigenică a bilei este foarte complexă, aceasta putînd conţine pînă la 10 antigene comune cu cele ale serului sanguin şi pînă la 8 substanţe antigenice proprii. Este, desigur, de presupus că cele comune cu serul sanguin vin în bilă din circulaţia sanguină la nivelul ficatului, poate, printr-un mecanism de filtrare-rezorbţie ca cel propus de I. Pavel pentru bilirubină [13].

Locul de formare a constituenţilor biliari proprii nu este cunoscut. Ei ar putea fi sintetizaţi de către celulele pereţilor arborizaţiei biliare la toate nivelurile sau distinct pe niveluri. Nu este exclus însă ca şi alte structuri conexe arborizaţiei biliare să participe la elaborarea unora dintre ei, printre care celula hepatică şi celula Kupfer.

Întrucît antigenele specifice bilei nu se găsesc în mod normal în circulaţia sanguină, secreţia lor ne pare o funcţie biliară pură, iar originea lor trebuie căutată cu precădere în aparatul biliar, care, după părerea noastră, nu secretă numai o substanţă mucoidă, cu rol lubrifiant, cum susţinea Lichtman (1949). Dacă însă prezenţa a numeroşi constituenţi,

[2] N. Chişiu, 1963, date nepublicate.

inclusiv cei antigenici indicaţi aici, este certă şi originea unora dovedită ori presupusă, funcţia lor este obscură (pentru cei care nu reprezintă deşeuri metabolice sau ar deţine funcţii în digestia şi absorbţia intestinală).

Antigenele biliare comune cu cele din serul sanguin ajung, probabil, în bilă *via* sinusoid — capilar biliar, cum pot sugera conexiunile morfologice arătate de Pavel sau cum interpretează Rawson [17] trecerea gamma-globulinelor din ser în bilă. Această interpretare ar putea fi spri-

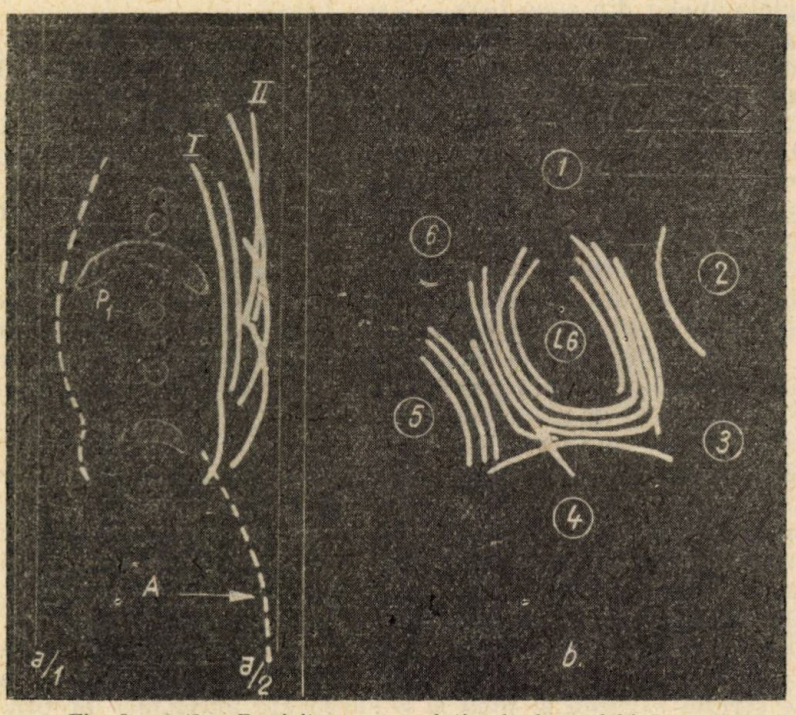


Fig. 8. — *a*/2 = Precipitarea cu soluţie de hemoglobină umană a componentelor din spotul electroforetic P_1 al bilei veziculare. Linia întreruptă *A* = albumină serică, redată pentru orientare topografică.
b = Precipitare imunologică prin dublă difuziune în agar; L6 = ser imun de iepure antialbuş de ou de găină; *2* şi *5* = albuş de ou de găină; *4* = ser de iepure la 30 min după injectarea intravenoasă de albuş de ou de găină; *6* = bilă veziculară de la iepure (două componente ale albuşului de ou au fost eliminate transhepatic în bilă).

jinită funcţional şi pe observaţia lui Cantacuzino, Ascoli şi Ohlenhut (citaţi de Bordet [1]), care sesizează trecerea unei proteine străine (albuş de ou) în bilă după injectarea ei intravenoasă la iepure.

În circuitul acestei treceri a proteinei de albuş din sînge în bilă n-ar fi interpusă celula hepatică. În acest sens am observat, utilizînd metoda de cito-imunofluorescenţă [3], că celula hepatică nu conţine proteine de albuş

[3] N. Chişiu şi I. Radu, date nepublicate.

în perioada în care se făcea de fapt trecerea acestor proteine din sînge în bilă, observaţie favorabilă concepţiei lui Pavel. Datele noastre precizează însă că numai unele din componentele proteice ale albuşului de ou pot trece în bilă (fig. 8 *b*/6), ceea ce arată că pasajul dintre sînge şi bilă este controlat activ, chiar dacă celula hepatică nu intervine sau nu se interpune în acest transfer de substanţe.

Observaţiile noastre mai precizează că, într-un ficat hipoxic, proteina de albuş pătrunde masiv în celula hepatică (iepure cu bronhopneumonie pasteuretică). Apreciem că astfel de stări pot influenţa şi schimburile reciproce dintre sînge şi bilă la nivelul ficatului, cointeresînd întregul sistem funcţional hepatobiliar, şi ar putea deci justifica, pe de o parte, variaţia componenţilor antigenici de natură sanguină din bilă de la caz la caz (în corelaţie, desigur, şi cu alte situaţii clinice), iar pe de altă parte trecerea constituenţilor proprii bilei în circulaţia sanguină.

O deficienţă vitaminică (ca un scorbut) ori alte influenţe patologice (ca stări toxice etc.), ca şi simpla anoxie sau hipoxie citată, ar mai putea modifica acest control al schimburilor de substanţe dintre sînge şi bilă. Aceste situaţii pot deschide uneori o complicaţie clinică la acest nivel, cum ar fi, de exemplu, litiaza biliară observată de noi la cobaiul scorbutic, fenomen asociat cu apariţia în bilă de noi constituenţi proteici ai serului sanguin [4].

Situaţii similare — ori obstacole mecanice — pot ocaziona însă şi un curent invers, adică trecerea în sînge a constituenţilor proprii bilei. Prezenţa bilirubinei „directe" în sînge la icterici favorizează această afirmaţie, mai ales dacă ţinem seamă de interpretarea lui Pavel şi Cîmpeanu privind locul de formare a acestui tip de bilirubină în ficat [13].

Dacă în astfel de situaţii există într-adevăr o trecere de substanţe din căile biliare în cele sanguine, atunci la icterici (cel puţin la unii) am considerat că ar trebui să se găsească în circulaţia generală şi substanţe antigenice specifice bilei alături de bilirubina directă. În cercetările făcute de noi am putut să identificăm în adevăr, cu ajutorul unui ser imun antibilă, prezenţa în serul sanguin a antigenelor specifice bilei la bolnavi cu icter prin obstrucţie şi la unii cu icter prin hepatită infecţioasă. Nu am putut identifica niciodată aceste antigene în serul normal sau în cîteva probe recoltate de la copii cu icter neonatal. Sprijinim această afirmaţie cu datele din figura 9.

Utilizînd produse provenite de la convalescent după hepatită, Proskuriakova [16] pune în evidenţă în ser, în bilă, în extractele de ficat şi splină antigene particulare (virotice ?), care nu ar fi specifice de organ. Antigenele din ser dădeau o linie de precipitare în zona gamma-globulinelor, iar cele din bilă se găseau în fracţiunea beta$_2$-globulinică, poziţii pe care le au şi unele dintre antigenele depistate de noi cu ajutorul serului imun antibilă.

Faptul că antigenele discutate de noi (poate şi cele evidenţiate de Proskuriakova) au poziţii de migrare diferite în ser faţă de bilă ar putea

[4] N. Chişiu, 1963, date nepublicate.

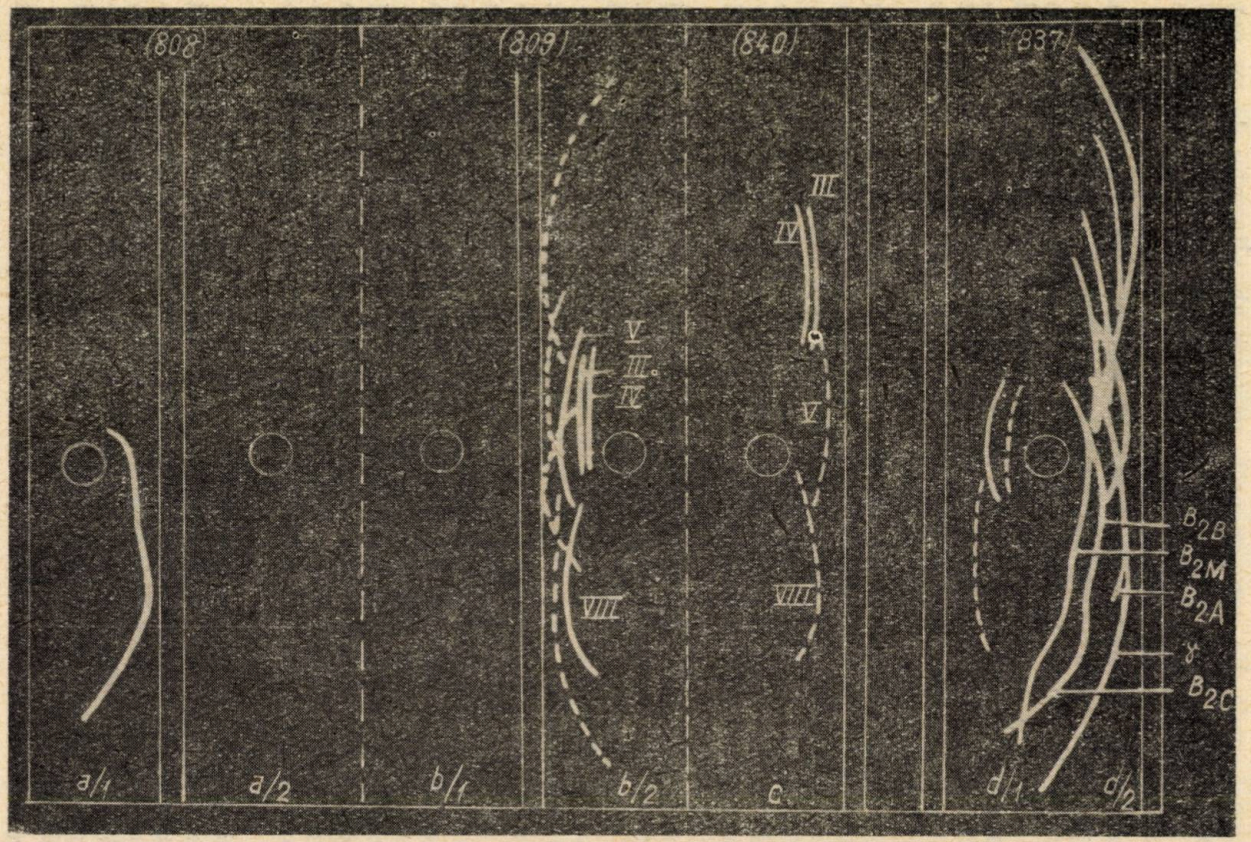


Fig. 9. — Componente antigenice proprii bilei, precipitate în serul sanguin al bolnav lor cu icter prin obstrucţie (*a*/1, *d*/1) sau icter prin hepatită (*b*/2) cu ser imun antibilă absorbit cu ser sanguin normal.
a/2 = ser normal; *b*/1 = ser icter neonatorum (nu dau arcul de precipitare obţinut în *a*/1 cu acelaşi ser imun); *c* = bilă hepatică; *d*/2 = precipitare cu ser antiser. Linii întrerupte în *b*/2 = arcuri de precipitare care ar corespunde fracţiunilor proteice normale din ser. Linii întrerupte în *c* şi *d*/1 = arcuri de precipitare de slabă intensitate.

ridica obiecţia că este vorba de substanţe diferite, şi nu de antigene de origine biliară, pătrunse în circulaţia sanguină în condiţia patologică dată.

Că de fapt există o identitate antigenică (uneori totală, iar alteori parţială) între aceşti constituenţi proprii bilei şi cei găsiţi în ser în unele ictere, o arată proba Ouchterlony (fig. 10).

Reiese de aici că, în situaţii patologice, substanţe antigenice proprii bilei pot pătrunde în circulaţia sanguină, nuanţînd şi complicînd aceste situaţii din punct de vedere medical. De fapt, mobilul practic al acestei cercetări a fost cel medical, adică diferenţierea tipurilor de ictere, fizio-

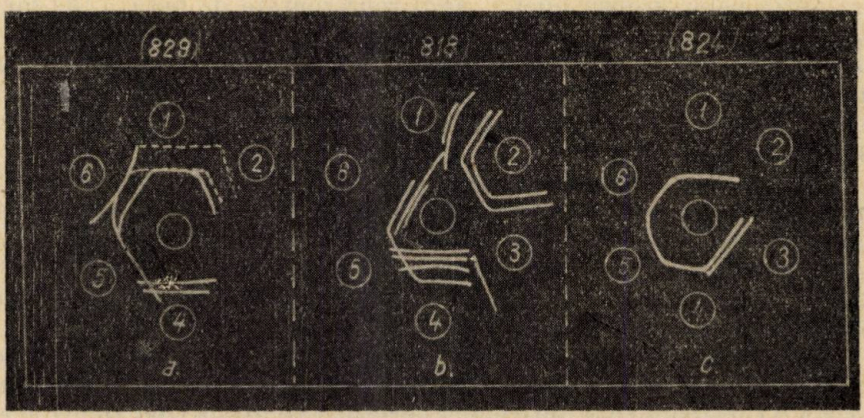


Fig. 10. — Reacţie de precipitare prin dublă difuziune în agar.
În centru = ser antibilă, absorbit cu ser sanguin normal în exces.
a) — *1*, *2*, *5* = bilă hepatică; *6* = ser icter (ciroză hepatică); *4* = ser hiperlipemic.
b) — *1* = ser om normal; *2* = ser antibilă neabsorbit; *3* = ser icter neonatorum; *4* = bilă veziculară; *5*, *6* = ser icter prin obstrucţie.
c) — *1*, *3*, *5* = ser icter prin obstrucţie; *2*, *4*, *6* = ser icter prin hepatită.

patologia lor şi implicaţia posibilă, în unele cazuri, a unui proces de autoagresiune posticteric, cu pornire de la aceste antigene specifice biliare, cărora, după părerea noastră, le-ar putea reveni o mare responsabilitate în diversele complicaţii după hepatită, inclusiv ciroza hepatobiliară.

Cu această orientare s-ar putea înţelege sensul prezenţei gammaglobulinelor (anticorpi) în căile biliare şi natura unui material antigenic în bilă [14], [7], [11]. În aceste situaţii, organismul poate reacţiona prin formare de anticorpi specifici faţă de antigenele biliare, anticorpi care s-ar îndrepta către locul de sinteză (şi de excreţie) al acestor antigene proprii biliare. După o astfel de interpretare, din lucrările citate se poate deduce că antigenele proprii biliare s-ar forma (cel puţin unele din ele) în celulele căilor biliare. Dacă la acest nivel are loc o reacţie imună antigen-anticorp, atunci şi-ar găsi o explicaţie şi chimiotactismul leucocitar [2], care schimbă componenţa celulară a focarelor hepatice atinse, şi în special a zonelor cu căi biliare atinse. Tot aici ar intra în considerare posibilitatea ca celulele sistemului reticulohistiocitar să capteze complexe imune formate liber

în circulaţia sanguină, situaţie pe care o sugerează comportarea specifică a anticorpilor localizaţi în zona $beta_2$-globulinelor. Astfel ar putea să fie cointeresate în procesele de mai sus, foarte frecvent, celula Kupfer şi peretele capilarului sinusoidal, la nivelul cărora studiile de morfopatologie hepatică arată frecvent reacţii.

De altfel, numeroşi autori au obţinut reacţii de precipitare a unui omogenat de ficat cu ser de la hepatici [6]. Credem că din acest omogenat reacţionau specific structurile biliare, implicit antigenele biliare puse în evidenţă în acest studiu.

Proteinele imune-antificat după Gökcen, ori, în interpretarea noastră, contra antigenelor proprii bilei — ar fi reprezentate de $beta_{2M}$ [9] sau de $beta_{2M}$ şi $beta_{2C}$, pe care Verain şi colab. [20] le găsesc crescute în ser la cirotici şi în unele cazuri de hepatită. Aceste proteine au determinanţi antigenici comuni cu gamma-globulinele, ceea ce ar explica datele de citoimunofluorescenţă obţinute de autorii citaţi mai sus, care utilizau un ser antigamma-globuline.

Noi am găsit constant cu ajutorul serului antibilă (adsorbit cu ser sanguin normal în exces) substanţe antigenice biliare în serul de la bolnav cu icter mecanic, dar aici ele apăreau cu o poziţie electroforetică modificată faţă de cea din bilă; în aceste seruri, poziţia imunoelectroforetică a substanţelor discutate mai sus sugerează comportarea fracţiunilor $beta_{2B}$- şi $beta_{2C}$-globulinice din serul sanguin.

Deşi imunoelectroforetic precipitatele obţinute în ser de icteric şi bilă se situau la niveluri diferite, proba Ouchterlony ne-a arătat că între ele există o corespondenţă antigenică parţială sau totală (fig. 10 *b*/1 şi *b*/6).

Faptul că în serul sanguin icteric precipitatul imun obţinut cu ser antibilă (absorbit cu ser sanguin normal) are poziţia imunoglobulinelor din grupul $beta_2$ (nu cea pe care antigenul corespondent o are în bilă) sugerează interpretarea că antigenul de origine biliară s-ar putea găsi în circulaţia sanguină legat la aceste imunoglobuline, în stadiul clinic în care acestea au fost deja elaborate. De altfel, reacţia de precipitare obţinută de noi în seruri icterice nici nu putea să aibă loc faţă de imunoglobulinele respective, căci anticorpii corespondenţi din serul imun utilizat fuseseră îndepărtaţi prin precipitare cu ser sanguin normal în exces şi centrifugare. Proba eficienţei acestei absorbţii se dă în figura 10 *b*, unde serul antibilă adsorbit nu dădea nici o linie de precipitare cu serul de om normal.

Folosind posibilităţile pe care le oferă clinicii metodele de cercetare imunochimice şi histoimunochimice, studii ulterioare vor trebui să adîncească analizarea datelor prezentate aici cu titlu orientativ şi programatic.

CONCLUZII

1. În bila hepatică şi veziculară umană pot fi puşi în evidenţă, prin imunoelectroforeză, o mare parte din constituenţii antigenici ai serului sanguin.

2. Sînt constant prezente în bilă albumina serică, frecvent gamma-globulina şi alte 8 fracţiuni din zonele $alfa_{1-2}$ - şi $beta_{1-2}$-globulinelor.

3. Îmbogățirea bilei cu constituenți antigenici de origine sanguină survine în corelație cu unele stări clinice.

4. Pe lîngă constituenții antigenici de origine plasmatică, bila hepatoveziculară mai poate conține pînă la 8 constituenți antigenici proprii.

5. Antigenii proprii bilei pot fi depistați în circulația sanguină, în unele condiții patologice, corelate cu sindromul icteric.

6. Nu se cunoaște semnificația fiziologică a acestor constituenți antigenici biliari, dar se întrevede o implicație a lor în unele stări patologice cu componentă autoimună, cum ar fi ciroza hepatobiliară.

Prezentată la redacție
la 19 aprilie 1965

Laboratorul experimental al Spitalului „Dr. I. Cantacuzino", București

BIBLIOGRAFIE

1. Bordet J., *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*, Masson et. Cie, Paris, 1939, p. 390.
2. Boyden S., *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes*, J. Exp. Med., **115**, 453 (1962).
3. Chișiu N., Velciu V., *Ulcer gastric, ulcer duodenal și deficiențe în sinteza colagenului la cobaiul scorbutic*, Simpozionul de patologie comparată, Călimănești, 14—16 octombrie, 1964.
4. Chișiu N., *Carențe vitaminice în alimentație și responsabilitatea lor în unele stări clinice*, Comunicare U.S.S.M., secția dietetică, februarie 1964.
5. Chișiu N., Cincă D., *Étude de quelques fractions proteiques de la perilimphe, immunologiquement similaire aux fractions respectives du serum sanguin, de la bile, du lait et du liquide cephalo-rachydien*, Communication à la Sect. O.R.L. de U.S.S.M., Bucarest, le 13 fevr. 1964.
6. Ciobanu V., *Aspecte imunopatologice ale hepatitei cronice și cirozei hepatice*, în *Probleme de hepatologie*, Edit. medicală, București, 1964, p. 317.
7. Cohen S., H. Ohta, Ef. Singer, H. Popper, *Immunochemical study of gamma - globulin*, în *Liver in hepatitis and post-necrotic cirrhosis*, J. Exp. Med., **111**, 285 (1960).
8. Cresti M., Dessi P., *L'elettroforesi della bile nello studio della patologia della vie biliari*, Minerva Medica, **49**, 291 (1958).
9. Gökcen M., *Autoimmunity in liver disease. Serological investigation and clinical correlations*, J. Clin. Invest., **40**, 1 043 (1961).
10. Lichtman S. S., *Diseases of the liver, gallbladder and billeducts*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1949, p. 997.
11. Paronetto F., T. Schaffner, H. Popper, *Immunochemical reaction of serum of patients with hepatic diseases with hepatic structure*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **106**, 216 (1961).
12. Pavel I., Teitel B., *Morphologie et rélations du canalicule-biliaire*, Sem. Hôp., Paris, **83**, 2 679 (1948).
13. Pavel I., Cîmpeanu S., *Fiziologia secreției biliare pigmentare, importanța ei pentru fiziopatologia unor ictere*, Fiziol. normală și patol., **11**, 3 (1965).
14. Popper H., *Possible role of immune processes in self — perpetuation of liver diseases*, în *II. Intern. Symp. Immunopathologie*, B. Schwabe — Basel, 1961, p. 303.
15. Popper H., Schaffner F., *Response of the liver to injury*; în *Progress in liver diseases*, Grune A. Stratton, 1961, p. 86.
16. Proskuriakova N. B., *Vîiavlenie antigenov i antitel u bolnîh infekționnim gepatitom metodom reakții pretipitații v gele*, J. Microbiol. Epidemiol. i immunol., **42**, 34 (1965).

17. Rawson A. G., *Human bile proteins-I Proteins identified by antibody to human serum*, Clinical Chemistry, **8**, 310 (1962).
18. Sotgiu G., G. Labo, P. Vannini, *Aspects de la composition biochimique de la bile au cours des hépatites aigües icterigènes*, Rev. Intern. d'Hepath., **12**, 575 (1962).
19. Sotgiu G., Labo G., P. Vannini, *Biochemical composition of bile during hepatic jaundice*, Rev. Intern. d'Hepatol., **12**, 586 (1962).
20. Verain m., L. Collesson, R. Frentz, J. P. Grilliat, M. Thiriot, *Immuno-élétrophorès et du serum sanguin chez les cirrhotiques et chez l'hépatiques ethylyque. Étude documentaire portant sur 68 cas*, Path. Biol., **9**, 2087 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 441 - 450 (1965)

INFLUENȚA CANTITĂȚII ȘI CALITĂȚII PROTEINELOR ASUPRA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME DIN FICAT

ILEANA DINU

613 : 2

Rezumat. — Pe 48 de șobolani albi, tineri s-a cercetat influența administrării, timp de 5 săptămîni, a unor rații semisintetice — normoproteică (18% cazeină), hipoproteică (8% cazeină) și maidică — asupra activității următoarelor enzime hepatice: succin-dehidrogenaza (SD), transaminaza glutamic-oxalacetică (GOT), fosfataza acidă, fosfataza alcalină, aldolaza și catepsina.

Din rezultatele obținute reiese că, în raport cu rația normoproteică, rația hipoproteică a determinat o scădere semnificativă a activității SD și GOT și o creștere a activității fosfatazei alcaline și aldolazei.

Comparativ cu rația de 8% cazeină, dieta maidică a determinat o creștere a activității SD, a fosfatazei acide, a fosfatazei alcaline și a catepsinei.

Influența compoziției rației alimentare asupra activității enzimelor a constituit obiectul a numeroase cercetări [16], [20], [23], [24], [26], [36], [37]. Interesul față de această problemă este determinat de faptul că studiul relației dintre diferite regimuri alimentare și activitatea enzimelor poate furniza date care să permită o mai bună cunoaștere a rolului acestora, precum și elemente practice importante pentru aprecierea mai exactă a valorii nutritive a produselor alimentare [19], [20].

Deși relația dintre structura rației alimentare și activitatea unor enzime este demonstrată, totuși există numeroase aspecte încă neelucidate [15].

Unul din aspectele deosebit de importante ale relației dintre alimentație și activitatea enzimelor, insuficient elucidat, este variația în timp a modificărilor enzimatice sub influența aportului alimentar. Actualitatea acestei probleme este evidentă, dacă ținem seama de faptul că s-a demonstrat capacitatea unor enzime de a se adapta în timp scurt la o suprasolicitare metabolică [15], [23]. Astfel, Harper [15], cercetînd activitatea arginazei hepatice la diete hiperproteice, constată că micșorarea ingestiei de proteine este însoțită de scăderea bruscă a activității enzimei.

Studiul modificărilor enzimatice în funcție de structura dietei prezintă interes și pentru cunoașterea capacității organismului de a se adapta la regimul respectiv. Acest aspect este deosebit de important

pentru regimurile dezechilibrate, întîlnite frecvent în practică, față de care reacția organismului se situează la limita dintre fiziologic și patologic [14]. În aceste cazuri apare interesant nu numai de a stabili capacitatea de adaptare a organismului, ci și posibilitatea de a readuce la normal activitatea enzimatică prin corectarea regimului alimentar.

În cercetările noastre ne-am propus să studiem influența variațiilor în cantitatea și calitatea proteinelor din hrană asupra activității unor enzime din ficat. În acest scop, am comparat efectul unui regim normoproteic (18% cazeină) cu altul hipoproteic (8% cazeină), natura proteinei de bază fiind aceeași (cazeina). Pentru a vedea efectul calității, am comparat un lot hrănit cu porumb ca sursă de material azotat, care se știe că prezintă un puternic dezechilibru aminoacidic [1], cu un lot hrănit cu cazeină 8%, care conținea aceeași cantitate de azot brut.

METODA DE CERCETARE

Experiențele au fost efectuate în două serii, pe un total de 48 de șobolani albi, tineri, proveniți din aceeași generație, apropiați ca greutate (34—39 g), fiecare serie cuprinzînd 3 loturi de cîte 8 șobolani (4 masculi și 4 femele).

Lotul I a primit un regim care conținea: cazeină 18%; amestec de săruri (după Osborne-Mendel) 4%; ulei de floarea-soarelui 8%; agar-agar 2%; drojdie de bere uscată 4% și amidon pînă la 100%. Fiecare animal mai primea săptămînal 270 u.i. de vitamină A, 100 u.i. vitamină D_2 și 1 mg vitamină E.

Lotul II a primit un regim cu aceeași compoziție ca și lotul I, numai că proporția de cazeină a fost redusă la 8%, diferența completîndu-se cu amidon.

Lotul III a fost hrănit cu un regim alcătuit din mălai, la care s-a adăugat 2% ulei de floarea-soarelui. În plus, animalele au primit vitamine A, D și E în mod similar cu primele două loturi.

Animalele au fost ținute în cuști individuale cu fund mobil. Apa și mîncarea s-au administrat *ad libitum*. Durata menținerii la regimuri diferențiate a fost de 5 săptămîni, timp în care s-au măsurat greutatea și cantitatea de hrană ingerată. Cunoscînd atît sporul ponderal, cît și consumul și compoziția regimului, s-a calculat eficiența proteinei (cîștigul în greutate pe gram de proteină ingerată). La sfîrșitul experienței, animalele au fost sacrificate prin decapitare, ficatul fiind extras, cîntărit și omogenat la gheață în manitol (0,25 M). În omogenatul 10%, filtrat printr-un tifon, s-a determinat activitatea următoarelor enzime: succindehidrogenaza (SD), transaminaza glutamic-oxalacetică (GOT), catepsina, aldolaza, fosfataza alcalină și fosfataza acidă.

Activitatea SD s-a măsurat după metoda lui Kun și Abood [17], folosind clorura de trifenil-tetrazolium ca acceptor final de electroni. Rezultatele au fost exprimate în γ de formazan format în timp de 15 min. Activitatea aldolazei s-a determinat după metoda lui Tovarniţki [31], adaptată la omogenat hepatic, iar activitatea enzimei a fost exprimată direct în extincțiile spectrofotometrice obținute. Activitatea GOT s-a măsurat cu metoda lui Bruyet [7], adaptată la omogenat hepatic, exprimînd activitatea enzimei în micromoli piruvat. Prin metoda lui Franklin [8] s-a determinat activitatea fosfatazei acide, iar activitatea fosfatazei alcaline a fost determinată cu aceeași metodă, înlocuind tamponul acid cu un tampon de veronal sodic 0,2 M, la pH 9,2 și folosind ca activator $MgCl_2$ în concentrație finală de 6 mM. Activi-

tatea ambelor enzime s-a exprimat în micromoli fosfat. Activitatea catepsinei s-a determinat după metoda Anson [5], rezultatele fiind exprimate în mg tirozină.

Pe lîngă măsurarea activității enzimelor menționate, s-au mai determinat cantitatea de proteine totale din ficat, după metoda lui Aldridge [4], și conținutul în acid dezoxiribonucleic al acestui organ, după metoda indicată de Webb și Lewy [9].

REZULTATE

Dat fiind că în ambele serii experimentale s-au obținut rezultate apropiate, în prelucrarea statistică valorile ambelor experiențe s-au inclus într-o singură medie, iar rezultatele obținute sînt prezentate sintetic în două tabele, cîte unul pentru fiecare dintre cele două aspecte studiate.

I. Influența cantității proteinelor asupra activității unor enzime hepatice

Deși cantitatea de hrană consumată de lotul I și de lotul II a fost apropiată, totuși regimul hipoproteic a afectat creșterea, animalele care au primit acest regim avînd, după 5 săptămîni, o greutate medie cu 13 % mai mică ($p < 0,02$). Eficiența proteică a fost cu 79 % mai crescută la lotul alimentat cu regimul hipoproteic decît la lotul martor ($p < 0,001$).

Greutatea ficatului, raportată la 100 g greutate corporală, nu a fost influențată semnificativ de conținutul regimului în proteine (tabela nr. 1). Conținutul în proteine totale al ficatului a fost cu 22 % mai redus decît la lotul care a primit regimul normoproteic ($p < 0,001$).

Tabela nr. 1

Influența regimurilor normoproteic (18%) și hipoproteic (8%) asupra creșterii șobolanului alb

Indicatori	18 % cazeină		8 % cazeină		
	Medie	ES	Medie	ES	P
Greutatea corporală inițială	34,3	0,53	36,8	0,70	>0,05
Greutatea corporală finală	119,8	5,4	104,2	4,1	<0,02
Ingesta	12,1	0,50	12,3	0,51	>0,05
Eficiența proteică	1,43	0,07	2,53	0,19	<0,001
Greutate ficat/100 g corp.	4,0	0,14	4,0	0,09	>0,05

Conținutul în ADN (tabela nr. 2) nu variază în funcție de aportul proteic al rației, însă, dacă rezultatele se raportează la g de proteină hepatică, în lotul hipoproteic apare o creștere relativă a ADN-ului, care poate fi atribuită scăderii proporției de proteine.

Rezultatele obținute în determinarea activității enzimelor studiate, la cele două regimuri alimentare, sînt prezentate în tabela nr. 2.

După cum rezultă, activitatea *succin-dehidrogenazei* din ficatul animalelor cu regim hipoproteic prezintă o scădere semnificativă față de

Tabela nr. 2

Influența regimurilor cu 18% cazeină și 8% cazeină

Indicatorii cercetați	Ficat umed					Proteină hepatică (g)				
	18%		8%			18%		8%		
	Medie	ES	Medie	ES	P	Medie	ES	Medie	ES	P
ADN[1]	1,45	0,04	1,36	0,03	>0,05	7 157	296	8 593	345	<0,003
Proteine[2]	204	5,1	160	4,9	<0,001	–	–	–	–	–
SD[3]	1,59	0,05	1,08	0,04	<0,001	7 767	187	6 770	261	<0,003
GOT[4]	728	38	525	40	<0,001	3 592	163	3 252	285	>0,05
Fosfataza acidă[5]	17	0,93	16	0,80	<0,05	84	4,8	101	74	>0,05
Fosfataza alcalină[5]	14	0,85	18	0,80	<0,002	72	4,6	115	80	<0,001
Aldolaza[6]	0,96	0,02	1,05	0,02	<0,003	4 794	186	6 784	274	<0,001
Catepsina[7]	2,14	0,12	2,07	0,09	>0,05	10,5	0,57	13,1	0,72	>0,005

[1] γ/mg
[2] mg/g
[3] γ formazan/mg
[4] micromoli piruvat/mg
[5] micromoli fosfat/g
[6] extincții spectrofotometrice/mg
[7] mg tirozină/g

lotul martor. Scăderea activității enzimei apare nu numai cînd ea se exprimă pe unitatea de ficat, ci și dacă se raportează la g de proteină, însă deosebirea este mai accentuată la raportarea rezultatelor pe mg de ficat umed.

Lotul care a primit regimul hipoproteic prezintă, de asemenea, o activitate mai scăzută a *GOT*. În timp ce valoarea medie a lotului martor este de 728 ± 38μM piruvat/g ficat umed, la lotul care a primit rația hipoproteică se înregistrează o valoare medie de 525 ± 40 μM, adică cu 28% mai mică ($p < 0,001$). Raportate la g de proteină hepatică, diferențele dintre lotul normo- și cel hipoproteic devin însă nesemnificative din punct de vedere statistic.

Activitatea *fosfatazei acide* nu prezintă diferențe între cele două regimuri alimentare.

Spre deosebire de fosfataza acidă, activitatea *fosfatazei alcaline* a fost mai intensă în cazul rației hipoproteice. Astfel, în timp ce valoarea medie a lotului martor este de 14 ± 0,85 μM fosfat, la rația hipoproteică se înregistrează o valoare medie de 18 ± 0,8 μM fosfat/g ficat umed, ceea ce însemnează o creștere de 29% ($p < 0,002$); însă, dacă se raportează la g de proteină hepatică, activitatea enzimei este cu 59% mai crescută ($p < 0,001$).

O creștere a activității enzimatice la regimul hipoproteic se înregistrează și în cazul *aldolazei*. Activitatea enzimei crește cu 41% în exprimarea rezultatelor pe g de proteină hepatică ($p < 0,001$).

Activitatea *catepsinei* nu este influențată de regimul hipoproteic, între valorile medii ale celor două regimuri neînregistrîndu-se diferențe. Deși în exprimarea rezultatelor pe g de proteină apare o creștere a activității enzimei de la 10,5 ± 0,57 la 13,10 ± 0,72 mg tirozină ($p < 0,005$), această creștere are un caracter relativ, fiind determinată de o scădere a concentrației proteinelor hepatice la regimul hipoproteic.

II. Influența calității proteinei

În 5 săptămîni, regimul maidic administrat a inhibat considerabil creșterea animalelor, greutatea corporală la finele acestei perioade prezentînd o scădere de 46% ($p < 0,001$).

Deși hrana s-a administrat *ad libitum*, animalele nu au compensat deficiența calității prin majorarea ingestiei, ci, dimpotrivă, aceasta a fost cu 33% mai redusă ($p < 0,001$), iar eficiența proteică cu 44% mai mică ($p < 0,001$). Greutatea ficatului raportată la 100 g corp, datorită sporului ponderal foarte mic, este în medie mai mare decît aceea a animalelor de la rația cu 8% cazeină (tabela nr. 3). Atît conținutul în proteine, cît și cel în ADN sînt semnificativ mai crescute la lotul hrănit cu regim maidic (tabela nr. 4).

Tabela nr. 3

Influența regimurilor hipoproteic (8%) și maidic asupra creșterii șobolanului alb

Indicatori studiați	8% cazeină		Porumb		P
	Medie	ES	Medie	ES	
Greutate corporală inițială	36,8	0,70	39,6	0,54	<0,003
Greutate corporală finală	104,3	4,1	56,5	1,46	<0,001
Ingesta	12,3	0,51	8,1	0,54	<0,001
Eficiența proteică	2,53	0,19	0,92	0,08	<0,001
Greutate ficat/100 g corp	4,0	0,09	4,6	0,19	<0,001

Această creștere a ADN-ului este mai marcată cînd rezultatele sînt raportate la mg de ficat umed. Astfel, lotul de la rația maidică are o valoare medie de 1,88 ± 0,1 γ, în timp ce lotul cu 8% cazeină prezintă o valoare medie de 1,36 ± 0,03 γ, ceea ce reprezintă o creștere de 38% ($p < 0,001$).

După cum rezultă din tabela nr. 4, activitatea enzimelor cercetate prezintă diferențe semnificative la lotul care a primit regimul maidic față de cel care a primit cazeină (8%).

Activitatea *SD* este semnificativ crescută la regimul maidic. La raportarea rezultatelor pe mg de ficat umed, creșterea este de 13%. Activitatea *GOT* nu este modificată semnificativ decît la raportarea rezultatelor pe g proteină hepatică. Scăderea înregistrată în raportarea rezultatelor pe g de proteină o considerăm ca relativă, fiind determinată de modificarea concentrației proteinelor. Activitatea *fosfatazei acide și alcaline* crește semnificativ la regimul maidic. Astfel, în cazul fosfatazei

Tabela nr. 4

Influența regimurilor cu 8% cazeină și maidic

Indicatori studiați	Ficat umed					Proteină hepatică (g)				
	8%		porumb			8%		porumb		
	Medie	ES	Medie	ES	P	Medie	ES	Medie	ES	P
ADN*	1,36	0,03	1,88	0,10	<0,001	8 593	345	10 662	323	<0,001
Proteine	160	4,9	181	6,4	<0,01	–	–	–	–	–
SD	1,08	0,04	1,23	0,02	<0,002	6 760	261	6 935	281	>0,05
GOT	525	40	432	31	>0,05	3 252	285	2 426	206	<0,02
Fosfataza acidă	16	0,8	20	0,6	<0,001	101	7,4	114	6,6	>0,05
Fosfataza alcalină	18	0,8	21	0,73	<0,01	115	8,0	119	6,9	>0,05
Aldolaza	1,05	0,02	1,06	0,01	>0,05	6 784	270	6 030	336	>0,05
Catepsina	2,07	0,09	2,58	0,13	<0,03	13,1	0,72	14,5	1,05	>0,05

* Aceeași legendă ca la tabela nr. 2.

acide se înregistrează la regimul maidic o valoare medie de 20 $\pm$ 0,6 față de 16 $\pm$ 0,8 micromoli fosfat/g ficat umed la lotul cu rația de cazeină 8%, ceea ce reprezintă o creștere de 25% ($p < 0,001$). În cazul fosfatazei alcaline, valoarea medie este de 21 $\pm$ 0,73 la regimul maidic, pe cînd la lotul cu cazeină ea este de 18 $\pm$ 0,8 micromoli fosfat, ceea ce reprezintă o creștere de 16% ($p < 0,01$).

Activitatea *aldolazei* nu a fost influențată.

Activitatea *catepsinei* în ficatul animalelor hrănite cu regim maidic a fost mai mare decît la lotul martor. Astfel, în timp ce la regimul maidic se înregistrează o valoare medie de 2,58 $\pm$ 0,13, la regimul cu cazeină 8%, valoarea medie este de 2,07 $\pm$ 0,09 mg tirozină/g ficat umed, ceea ce reprezintă o creștere de 24%.

DISCUȚII

Din compararea rezultatelor obținute la regimurile normo- și hipoproteic reiese că, din punctul de vedere al răspunsurilor lor la cele două niveluri de cazeină, enzimele examinate pot fi împărțite în mai multe categorii. În prima categorie ar intra SD și GOT, a căror activitate este scăzută la regimul hipoproteic.

Această constatare confirmă datele din literatură care indică o scădere a nivelului unor componenți ai lanțului transportorilor de elec-

troni. Williams [2] a stabilit existenţa unui declin în activitatea sistemului succinoxidazic, ca răspuns la depleţia proteică. Pentru SD, autorul a găsit date similare cu ale noastre. Scăderea activităţii SD la regimuri cu niveluri joase de proteine a fost constatată şi de alţi cercetători [18], [29], [35]. Muramatsu şi Ashida [23] constată că, la hrănirea şobolanilor tineri cu o dietă cu nivel de 10% cazeină, scăderea în activitatea enzimei este de 57%.

Micşorarea activităţii GOT paralel cu ingesta proteică a fost constatată şi de alţi autori [27], [33], [34]. Muramatsu şi colab. [23] încadrează GOT în categoria de enzime a căror activitate variază proporţional cu nivelul proteic al raţiei. Din cifrele obţinute de noi rezultă însă că, deşi la regimul hipoproteic GOT arată o scădere ca şi SD, există totuşi diferenţe între răspunsurile celor două enzime. Astfel, în timp ce SD prezintă valori semnificativ scăzute la lotul care a primit raţia hipoproteică în raport cu lotul normoproteic atît pe unitatea de ficat umed, cît şi în raportarea la g de proteină hepatică, pentru GOT diferenţele apar numai dacă rezultatele se raportează la unitatea de ficat umed.

Fosfataza alcalină şi aldolaza pot fi încadrate în a doua categorie de enzime, a căror activitate este crescută la regimul hipoproteic în ambele forme de raportare. Cercetările lui Ross şi colab. [24] au găsit o relaţie între nivelul cazeinei din raţie şi activitatea fosfatazei alcaline pînă la un nivel de 30% proteine. Activitatea enzimei este invers proporţională cu nivelul proteic, activitatea cea mai mare apărînd în carenţa proteică. Nivelul enzimei se modifică mai rapid decît numărul de celule pe unitatea de ţesut proaspăt, fapt care arată că are loc o creştere a concentraţiei. Aceasta este interpretată de unii autori [29] ca expresia lezării parenchimului hepatic, urmată de o tulburare în transferul fosfatazei alcaline din ficat în canaliculii biliari. Miller [21], supunînd şobolani la inaniţie proteică timp de 7 zile, a constatat scăderea fosfatazei alcaline raportată la greutatea ficatului dinainte de foame, însă per g de ficat umed nu a observat modificări. Muramatsu [23] a găsit că activitatea maximă a fosfatazei alcaline este maximă după 29 de zile de regim aproteic.

În categoria a 3-a de enzime s-ar încadra *catepsina* şi *fosfataza acidă*, a căror activitate nu se modifică sub influenţa regimului hipoproteic, Miller [20] şi alţi autori nu au constatat modificări ale activităţii catepsinei nici după reducerea hranei şobolanilor la 50% din raţia martorilor. Shan-Ming-Chen şi colab. [25] au găsit valori oscilante ale activităţii acestei enzime atît la depleţia, cît şi la repleţia proteică, iar Muramatsu [23] consideră catepsina o enzimă care nu variază semnificativ la diferitele niveluri de aport proteic.

Lipsa de modificări în concentraţia ADN-ului (în raportarea la mg ficat umed) este conformă cu datele bibliografice, din care reiese că în depleţia proteică concentraţia ADN-ului per celulă rămîne constantă. Studii histologice [38] demonstrează că la foame proteică, proporţional cu scăderea greutăţii ficatului, are loc reducerea volumului celulelor, celula ajungînd la 43% din volumul anterior, iar nucleul la 67%. Cu toată scăderea volumului celulelor, concentraţia ADN-ului rămîne constantă.

Din rezultatele obținute prin compararea efectului calității proteinelor, proporția fiind aceeași, reiese că animalele hrănite timp de 5 săptămîni cu rația maidică prezintă deosebiri importante față de martor, greutatea corporală fiind cu 46% și eficiența proteică cu 64% mai reduse decît la animalele care au primit rația cu 8% cazeină.

Proteinele și ADN prezintă o creștere la regimul maidic pe unitatea ponderală de ficat. Această creștere ar putea fi considerată ca relativă datorită scăderii greutății ficatului. Observațiile noastre asupra creșterii conținutului în proteine s-ar putea corela cu unele cercetări mai recente, care arată că enzimele aminoacid-activatoare, care răspund de pasul inițial în sinteza proteinelor din ficatul șobolanilor carențați proteic, prezintă o capacitate de 3—4 ori mai mare a activității lor [2]. Modificări similare se înregistrează și în activitățile fosfatazei alcaline și ale catepsinei, care sînt semnificativ crescute la loturile care au primit regim maidic.

Diferențele obținute între regimul maidic și cel cu cazeină 8% pot fi atribuite faptului că rația maidică nu asigură nevoile organismului în unii aminoacizi, precum și în unele vitamine din grupul B [1]. Ținînd seama de faptul că încercările de a suplimenta rația maidică cu vitamine sau aminoacizi nu au reușit să înlăture complet deficiențele proprii rației maidice [3], [10], [11], [28], se pune problema dacă efectul distrofiant al porumbului nu se datorește în parte dezechilibrului existent între eucină și izoleucină.

Datele din literatură privind rolul acestui dezechilibru în distrofia maidică sînt contradictorii. Astfel, în timp ce Gopalan [12] susține existența unui dezechilibru leucinic în porumb, Truswell [32] nu confirmă aceste concluzii.

Rezultatele noastre privind scăderea creșterii și a ingestiei de alimente la animalele supuse la regim maidic pot fi interpretate în lumina concluziilor lui Harper [13] ca semne ale dezechilibrului aminoacidic. Verificarea acestei ipoteze constituie obiectul cercetărilor noastre ulterioare.

Prezentată la redacție
la 8 iunie 1965

Institutul de igienă și protecția muncii,
Secția igiena alimentației

BIBLIOGRAFIE

1. *** *Maize and maize diets*, F.A.O., Roma, aprilie, 1953.
2. *** *Protein depletion and electron transport*, Nutr. Revs., **22**, 5, 155 (1964).
3. Aizicovici H., *Contribuții la studiul factorilor care determină efectul distrofiant al porumbului*, Autoreferat, Iași, 1964.
4. Aldridge W. N., *Liver and brain mitochondria*, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
5. Anson M. L., *The estimation of cathepsin with hemoglobin*, J. Gen. Physiol., **22**, 79 (1939).

6. Barrows C. H., Roeder L. H., *Effects of reduced dietary intake on the activities of various enzymes in the livers and kidneys of growing male rate*, J. Gerontol., **81**, *2*, 135 (1963).

7. Bruyet P., Meignien-Gauthier Ch., Delaunay A., *À propos du dosage des transaminases. Dosage simultanés de la GOT et GPT*, Ann. Biol. Clin., **16**, *10*, 661 (1958).

8. Franklin T. J., *The influence of age on the activities of some acid hydrolases in the rat liver and kidney*, Biochem. J., **82**, 118 (1962).

9. Glick D., *Methods of biochemical analysis*, **6**, 10—12 (1958).

10. Gonţea I., Suţescu P., Cosma V., Cocora D., *Cercetări asupra posibilităţilor de contracarare a efectului distrofiant al porumbului*, Igiena, **11**, 4, 281 (1962).

11. Gonţea I., Suţescu P., *Acţiunea distrofiantă a porumbului şi posibilităţi de contracarare*, St. cerc. ig. şi sănăt. publ., 1964, p. 55.

12. Gopalan C., Srikantia S. G., *Leucine and pellagra*, Lancet, *I*, 954 (1960).

13. Harper A. E., *Aminoacid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and aminoacid imbalance*, J. Nutrition, **68**, *3*, 405 (1959).

14. Harper A. E., *Aminoacid imbalances, toxicities and antagonisms*, Nutr. Revs., **14**, *8*, 225 (1956).

15. Ashida K., Harper A. E., *Metabolic adaptation in higher animals. VI. Liver arginase activity during adaptation to high protein diet*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **107**, 151 (1961).

16. Knox W. E., Auerbach V. H., Lin E. C. C., *Enzimatic and metabolic adaptations in animals*, Physiol. Rev., **36**, *2*, 165 (1956).

17. Kun E., Abood L. G., *Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride*, Science, **109**, 144 (1949).

18. Kshirsagar S. G., Patwardhan V. N., *The influence of protein deficiency on the liver albino rats*, Ind. J. Med. Res., **46**, *6*, 817 (1958).

19. Mezincescu M. D., Popescu-Ştefănescu A., *Méthode pour l'étude des variations contingentes du besoin azoté*, Arch. Sci. Physiol., **16**, *3*, 245 (1962).

20. Miller L. L., *The loss and regeneration of rat liver enzymes related to diet protein*, J. Biol. Chem., **186**, 253 (1950).

21. Miller L. L., *Changes in rat liver enzymes activity with acute inanition*, J. Biol. Chem., **172**, 113 (1948)

22. Muramatsu K., Sato T., Ashida K., *Dietary protein level and the turnover rate of tissue proteins in rats*, J. Nutrition, **81**, *4*, 427 (1963).

23. Muramatsu K., Ashida K., *Effect of dietary protein level on growth and liver enzymes activities of rats*, J. Nutrition, **76**, *2*, 143 (1962).

24. Ross H., Batt W., *Alkaline phosphatase activity and diet.*, J. Nutrition, **60**, *1*, 137 (1956).

25. Shan-Mimg Chen, Ymh-Ting King, Re-Han Liung, Cheh Sun, Chih-Chi Yung, Chae-wen Shen, Ying-Lai Wang, *Protein metabolism. I. Effect of protein depletion and repletion on rat liver protein, RNA and DNA, and on the activities of several liver enzymes*, Chem. Abstr., **54**, 1 989 *a* (1960).

26. Soberon G., Sanchez G., *Changes in effective enzyme concentration in the growing rat liver. I. Effects of fasting followed by repletion*, J. Biol. Chem., **236**, *5*, 1 602 (1961).

27. Som J. M., Esh G. C., *Effect of pulse protein diets on the transaminase activity of plasma and other tissues in rats*, Am. Biol. Chem. Exptl. Med., **23**, *7*, 243 (1963).

28. Sporn A., Fostiropol A., *Influenţa naturii proteinelor şi a unor vitamine asupra distrofiei maidice la cîine*, St. cerc. ig. şi sănăt. publ., 1964, p. 91.

29. Srinivasan P. R., Papwardhan V. N., *The effect of protein deficiency (a) some liver, constituents and (b) enzymes in liver pancreas and blood plasma in albine rats*, Ind. J. Med. Res., **43**, *1*, 1 (1955).

30. Tasker P. K., Rao M., Narayama A., Indiramma K., Swaminathan M., Sreenivasan A., Subrahmanyan V., *Supplimentary value of peanut flour and skim milk powder and their blends to maize-tapioca diet*, Ind. J. Med. Res., **50**, *3*, 468 (1962).

31. Tovarniţkii V. I., Voluiskaia E. N., *Biochimiceskii metod rannei diagnostiki bolezni Botkina (epidemiceskogo ghepatita)*, J. Mikrobiol. Epidemiol. i. Immunol., **10**, 67 (1955).

32. Truswell A. S., Goldsmith G. A., Pearson W. N., *Leucine and pellagra*, Lancet, *I*, 778 (1963).

33. Waldorf M., Harper A. E., *Metabolic adaptation in higher animals. VIII. Effect of diet on ornithine alfa cete glutarate transaminase*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **112**, 955 (1963).

34. Waldorf M., Marlyn C. K., Lenkswiler H., Harper A. E., *Metabolic adaptation in higher animals. VII. Response of glutamate-oxaloacetate and glutamate-pyruvate transaminases to diet*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **112**, 764 (1963).

35. Williams J. N. Jr., *Response of the liver to prolonged protein depletion. IV. Protection of succinic oxidase and succinic dehydrogenase by dietary methionine and cystine in protein free rations*, J. Nutrition, **82**, *1*, 51 (1964).

36. Williams J. N., Elvehjem C. A., *The relation of aminoacid availability in dietary protein to liver enzymes activity*, J. Biol. Chem., **181**, 559 (1949).

37. Willmer J. S., Foster T. S., *Enzymatic and metabolic adaptation. I. Changes in intact rats subjected to dietary modifications*, Canad. J. Biochem. Physiol., **40**, 7, 953 (1962).

38. Zoletacova T. A., *O nekotorîh destruktivnîh i vosstanovitelnîh protessah v peceni pri golodanii*, Biul. Exper. Biol. i Med., **8**, 112 (1936).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 451 – 454 (1965)

MODIFICAREA CONDUCTIBILITĂȚII ELECTRICE LA BIOPOLIMERII IRADIAȚI

GHEORGHE FURNICĂ și MINODORA RADU

616.3

Rezumat. — S-au efectuat determinări de conductibilitate electrică asupra dispersiilor apoase de γ-globulină și acid dezoxiribonucleic înainte și după iradierea lor cu doze mari ($1,5-2,0 \cdot 10^6$ r). Rezultatele obținute arată modificări ale valorilor conductibilității după iradiere, care în majoritatea cazurilor sînt inferioare valorilor inițiale. Cu această ocazie se evidențiază existența unor procese ascunse în macromolecula iradiată, care se manifestă ulterior, în condiții energice, prin înregistrarea unor noi transformări.

Conductibilitatea soluțiilor sau sistemelor disperse ale biopolielectroliților macromoleculari este de natură ionică și, în consecință, va depinde — alături de o serie de alți factori — și de principalele caractere ale ionilor. Natura modificărilor provocate biopolielectroliților de către radiațiile ionizante poate fi urmărită și prin studiul variației conductibilității sistemelor acvodisperse. Astfel apar posibilitățile unor interpretări legate de numărul funcțiunilor disociabile ale polimerilor. Menținîndu-se aceeași geometrie a electrozilor și aceeași concentrație, se pot determina eventualele modificări în conductibilitatea sistemelor disperse ale proteinelor și acizilor nucleici iradiați în raport cu sistemele neiradiate. Cercetările în acest domeniu au fost mai sporadice, constatîndu-se unele modificări în conductibilitatea electrică la proteinele iradiate [1], [2].

METODA DE LUCRU

Sistemele acvodisperse ale biopolimerilor de γ-globulină (NBC) și ADN (Heidelberg) au fost iradiate cu radiații γ de la Co^{60}, în doze de $1,5 \cdot 10^6$ și $2 \cdot 10^6$ r. Doza a fost determinată chimic prin $FeSO_4$ [3], [4]. Lichidul iradiat sau neiradiat a fost introdus în celule de sticlă cu electrozi de Pt, etalonate, utilizîndu-se pentru fiecare probă iradiată cîte o probă martor neiradiată, de concentrație egală.

Măsurătorile s-au efectuat cu ajutorul unei punți cu fir, cuplată la un aparat de nul și oscilograf catodic Tesla. S-a lucrat în curent de înaltă frecvență, de 1000 de oscilații/sec, proba menținîndu-se la temperatură constantă cu ajutorul unui ultratermostat Höppler.

Dializa sistemelor apoase s-a efectuat într-un dializor simplu, cu membrană de celofan, într-un curent de apă distilată, la temperatura de 4 °C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele determinărilor efectuate asupra dispersiilor de γ-globulină iradiată, dializate şi nedializate, asupra complexului γ-globulină — AET[1] şi asupra proteinatului de sodiu dializate sînt redate în tabelul nr. 1. Rezultatele determinărilor efectuate asupra dispersiilor de ADN — iradiate şi neiradiate, sau dializate şi nedializate — sînt date în tabela nr. 2.

Analiza rezultatelor expuse în tabelele nr. 1 şi 2 ne conduce la următoarele constatări :

Iradierea γ-globulinei cu doza de 2.10^6 r provoacă scăderea conductibilităţii dispersiei apoase, scădere net evidenţiată în urma dializei efectuate timp de 60 de ore după iradiere. Aceasta arată că macromolecula polielectrolitică iradiată, care n-a dializat, a pierdut o serie de funcţiuni ionogene, micşorîndu-şi astfel capacitatea de migrare electrică prin apă. În acelaşi timp, diferenţa de conductibilitate dintre soluţiile iradiate şi

Tabela nr. 1

Variaţia conductivităţii soluţiilor 2% de γ-globulină, iradiată cu doza de 2.10^6 r

Natura soluţiei	Temperatura determinării (°C)	Rezistivitatea obţinută (ohm/cm)	Conductivitatea calculată (10^{-5} mho·/cm)	Variaţia conductivităţii faţă de soluţia de referinţă (%)
Sol. neiradiată (nr. 1)	37	5 355	53,9	—
	50	6 529	43,9	—
Sol. neiradiată (nr. 2) şi dializată 60 ore la 4 °C	10	27 770	10,40	—
	37	15 578	17,90	—
	50	12 639	22,07	—
Sol. iradiată (nr. 1)	37	5 563	51,7	— 4
	50	6 699	41,6	— 6
Sol. iradiată (nr. 2) şi dializată 60 ore la 4 °C	10	41 085	7,2	—31
	37	22 573	12,79	—29
	50	18 117	15,94	—26
Globulină + AET (30 mg/ml) în tampon fosfat pH 7, dializată 60 ore la 4 °C	10	76 650	36,39	+18
	37	42 717	65,31	+19
	50	34 906	79,92	+18
Globulină în tampon fosfat pH 7, dializată 60 ore la 4 °C	10	96 005	30,08	—
	37	53 975	53,50	—
	50	43 801	65,93	—

[1] AET = aminoetilen-izotiuroniu.

Tabela nr. 2

Variația conductivității soluțiilor apoase de ADN iradiate

Felul soluției	Temperatura determinării (°C)	Rezistivitatea obținută (ohm/cm)	Conductivitatea calculată (10^{-5} mho/cm)	Variația conductivității față de soluția de referință (%)
Sol. saturată, nefiltrată și neiradiată	37	1 566	184,0	—
	50	5 080	56,8	—
Sol. saturată, nefiltrată, iradiată cu $2 \cdot 10^6$ r	37	1 940	104,3	−21
	50	4 363	63,9	− 9,5
Sol. saturată, filtrată neiradiată (nr.1)	10	12 119	23,02	—
	37	7 727	36,10	—
	50	6 300	44,28	—
Sol. saturată filtrată, iradiată cu $1,5 \cdot 10^6$ r (nr. 1)	10	12 583	22,95	− 1
	37	7 548	38,27	+ 6
	50	6 618	43,63	− 2
Sol. saturată filtrată neiradiată (nr. 2)	37	7 733	36,03	—
	50	6 486	43,01	—
Sol. saturată filtrată, iradiată cu $2,5 \cdot 10^6$ r (nr. 2)	37	6 641	42,01	+15
	50	5 225	49,60	−15
Sol. saturată filtrată, neiradiată, apoi dializată 4 zile (nr. 3)	10	17 824	16,20	—
	37	10 138	28,40	—
	50	8 293	34,82	—
Sol. saturată filtrată, iradiată cu $1,5 \cdot 10^6$ r, apoi dializată 4 zile (nr. 3)	10	18 409	15,15	− 6
	37	10 582	26,36	− 7
	50	8 624	32,35	− 7

nedializate relevă faptul că, în urma acțiunii radiațiilor, se desprind din macromoleculă fracțiuni dializabile ce conțin funcțiuni ionogene. Acestea din urmă mențin o conductibilitate electrică ridicată a soluției nedializate (tabela nr. 1).

Complexarea γ-globulinei cu AET atrage după sine creșterea conductibilității, probabil, datorită apariției pe macromoleculă a noi funcțiuni ionogene. Rezultatul menționat permite să se formuleze ipoteza că, în majoritatea cazurilor, complexarea AET-ului la globulină are loc prin intermediul funcțiunilor — SH, menținîndu-se libere în aceste condiții funcțiunile — NH_2, care au caracter electric mai accentuat. Nu se exclude pe această cale posibilitatea complexării grupelor — NH_2 ale AET-ului la funcțiunile — COOH ale globulinei, realizîndu-se în felul acesta săruri cuaternare cu o tendință mărită de disociere. Interesant de remarcat este conductibilitatea crescută a γ-globulinei în tampon fosfat la pH 7 și apoi dializată 60 de ore, perioadă în care s-au eliminat sărurile anorganice. Se poate considera că proteinatul de sodiu format, cu un grad de disociere mai mare, imprimă polielectrolitului un număr sporit de sarcini electrice.

Iradierea sistemelor de ADN relevă efecte asemănătoare acelora constatate în cazul globulinei (tabela nr. 2). De remarcat că, la sistemele suprasaturate în care se găseşte ADN nedispersat (solid) şi nedializat, conductibilitatea, după iradiere, scade la temperatura de 37 °C şi creşte la temperatura de 50 °C. La sistemele filtrate şi iradiate cu $1{,}5 \cdot 10^6$ r, fenomenul este inversat, iar variaţia de conductibilitate este mică. Iradierea cu o doză mai mare, şi anume cu $2{,}5 \cdot 10^6$ r, atrage după sine accentuarea fenomenului. Prin dializa lichidului după iradiere se scoate în evidenţă numai un proces de scădere a conductibilităţii lichidului.

Rezultatele menţionate se pot interpreta astfel : iradierea ADN-ului în mediu apos determină desprinderea unor fracţiuni cu funcţiuni ionogene alături de H_3PO_4, care măresc astfel conductibilitatea lichidului. În urma eliminării lor prin dializă, macromolecula iradiată rămîne cu un număr mai mic de funcţiuni ionogene. Variaţiile pe care le determină temperatura pot fi interpretate ca o consecinţă a unor modificări „ascunse" în macromoleculă, ce se evidenţiază în urma labilizării şi desfacerii întîrziate la temperaturi mai mari a legăturilor chimice. Trebuie precizat că la temperatura de 50 °C s-a observat degajarea de bule în jurul electrozilor, ceea ce indică descompunerea macromoleculei. Fenomenul remarcat determină o polarizare a electrozilor, şi ca atare rezultatele la 50 °C nu pot fi considerate riguros ştiinţifice. Acest proces este cu mult mai evident şi intens la macromoleculele iradiate, indicînd transformări mai profunde.

CONCLUZII

1. Iradierea în mediu apos cu radiaţii γ ale Co^{60} a polielectroliţilor macromoleculari de γ-globulină şi ADN determină scăderea conductivităţii lor electrice.

2. Prin iradiere, din macromolecula polielectroliţilor respectivi se desprind fracţiuni moleculare cu greutate moleculară mult mai mică, care au funcţiuni disociabile şi, prin urmare, pot dializa.

3. Macromolecula polielectroliţilor de γ-globulină şi ADN prezintă, după iradiere, transformări „ascunse", care pot fi evidenţiate în condiţii mai energice, prin ridicarea temperaturii.

Prezentată la redacţie
la 8 iunie 1965

Laboratorul de radioizotopi al Institutului de igienă şi protecţia muncii, Bucureşti, şi Centrul de cercetări de chimie organică al Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti.

BIBLIOGRAFIE

1. F. A. Bovey, *The Effects of Ionizing Radiation on Natural and Synthetic high Polymers*, Interescience Publishers, New York, 1958.
2. G. Furnică, *Radiaţiile radioactive în chimia macromoleculelor*, Anal. rom. sov., **7**, 8 (1962).
3. A. Drăguţ, G. Ioanid, I. Drimuş, *Iniţierea reacţiilor de oxidare cu ajutorul radiaţiilor radioactive*, Revista de chimie (ASIT), **10**, 589 (1959).
4. Gh. Furnică, A. Dimitriu, *Studiul acţiunii radiaţiilor asupra polielectroliţilor macromoleculari. IV. Degradarea radiolitică a proteinelor*, St. cerc. biochim., **6**, 411 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 455–463 (1965)

INFLUENȚA INFECȚIEI VIROTICE ASUPRA CANTITĂȚII ȘI CALITĂȚII CONȚINUTULUI ÎN ALCALOIZI DIN *VINCA ROSEA* L. *(CATHARANTHUS ROSEUS* G. DON*)*

AUREL GHEORGHIU, ELENA IONESCU-MATIU și PETRE G. PLOAIE

615.771.7 : 576.858

Rezumat. — Frunzele plantelor infectate cu virus de tipul „aster yellows" au un conținut redus în alcaloizi (urme), pe cînd în rădăcini conținutul în alcaloizi crește, fiind mai mare de peste două ori decît în rădăcinile plantelor sănătoase, ceea ce arată că la *Vinca rosea* L., virusul intensifică procesul de formare a alcaloizilor, iar biosinteza acestora are loc în rădăcini și nu în frunze.

De asemenea, se arată că infecția virotică provoacă totodată și o modificare calitativă a compoziției alcaloizilor, mai ales împiedicarea biosintezei vincaleucoblastinei, principiul activ de bază cu acțiune anticanceroasă din *Vinca rosea* L.

Vinca rosea L. a făcut obiectul a numeroase cercetări care au devenit din ce în ce mai importante o dată cu descoperirea alcaloizilor cu acțiune citostatică.

Vinca rosea L., sinonim cu *Catharanthus roseus* G. Don, *Lochnera rosea* (L.) Reichb. f., este o plantă pantropicală din familia Apocinaceae, probabil originară din Madagascar și răspîndită în India, Indochina, Indonezia, Filipine, Australia, Africa de Sud, Africa de răsărit, America de Nord, Indiile de Vest, Guiana, Brazilia și cultivată și în Europa. Crește ca subarbust, lemnos la bază, înalt de 40—80 cm, cu ramuri erecte. Are frunze opuse oblung și pețiolate (lungi de 3—8 cm și late de 1,5—3 cm), cu baza acută și cu vîrful mucronat. Planta este pubescentă cînd este tînără, dar există și o varietate glabră. Florile sînt roz-violete sau albe. Foliculele sînt lungi de 2,5—4 cm și cu diametrul de 2—3 mm, conținînd 12—20 de semințe, fiecare cu un tegument subțire, negru.

Primele cercetări asupra plantei *Vinca rosea* L. au fost făcute de Greshoff (23), care a semnalat prezența alcaloizilor. Ulterior s-a reușit să se izoleze din *Vinca rosea* L. 49 de alcaloizi [40].

Beer [4] a observat că extractele din *Vinca rosea* L. au o acțiune leucopenică și prin cromatografia pe hîrtie a separat cinci spoturi alcaloidice, dintre care numai unul a provocat la șobolani leucopenie.

Cutts şi colab. [8] au obţinut de asemenea, cu extracte din plantă pe şoareci, o reducere marcantă a numărului de leucocite şi o scădere a formării măduvei osoase.

Bazîndu-se pe aceste observaţii, Svoboda [38], Johnson şi colab. [20, 21], Svoboda şi colab. [39] au dovedit că unii alcaloizi din această specie prezintă o acţiune antileucemică, reproductibilă la şoareci DBA/2 infectaţi cu leucemia P—1534 (leucemia limfocitică) transplantată.

Dintre alcaloizii izolaţi din *Vinca rosea* L., o acţiune oncolitică au indicat : vincaleucoblastina (VLB), leurosina, leurocristina şi leurosidina. Aceşti alcaloizi au fost încercaţi pe diferite tipuri de neoplasm. Noble şi colab. [33], [34] şi Cutts şi colab. [9], făcînd cercetări cu vincaleucoblastina (VLB) pe şoareci, au constatat o puternică leucopenie şi au descoperit acţiunea antitumorală a acestui alcaloid în leucemia L— 1 210 şi P—1 534 transplantată la şoareci BDV şi DBA/2, în leucemia AK, transplantată la şoareci AK, precum şi în Sarcoma 180, transplantată pe şoareci elveţieni. De asemenea au obţinut cu vincaleucoblastina o scădere în suprafaţă a carcinomului Ehrlich la şoareci elveţieni şi a tumorii mamare C_3H.

Johnson şi colab. [21] au arătat că în leucemia P—1 534, pe şoareci DBA/2, leurosina este mai puţin activă decît vincaleucoblastina, iar Hodes şi colab. [16], făcînd cercetări cu vincaleucoblastina în tratamentul diferitelor maladii maligne, au constatat o scădere accentuată a numărului total de leucocite şi a întinderii tumorii. Hertz şi colab. [12] au obţinut rezultate avantajoase cu vincaleucoblastina (VLB) în tratamentul coriocarcinomei şi carcinomei sînului.

Pentru stabilirea cîmpului de activitate al vincalecoblastinei s-au tratat diferite boli neoplasmice, cele mai bune şi mai frecvente rezultate obţinîndu-se în maladia Hodgkin în stare foarte avansată [16], [45], [1], [10], [46].

Prin aceasta s-a dovedit că vincaleucoblastina este un agent oncolitic sigur cînd este întrebuinţată cu precauţie.

Cercetările clinice preliminare cu leurocristina au arătat un procentaj marcant de vindecări hematologice complete în leucemia limfocitică acută, precum şi rezultate pozitive într-un spectru de tumori solide [2], [5], [6], [7] [22], [37]. Totuşi, amplasarea corectă a leurocristinei în arsenalul clinic în procesele oncolitice necesită studii în continuare.

De asemenea, nici asupra leurosidinei nu s-au putut obţine pînă în prezent informaţii clinice de bază.

În ultimii ani, *Vinca rosea* L., datorită alcaloizilor antitumorali, a atras atenţia lumii întregi, iar în diferite ţări se fac cercetări cu privire la stabilirea agrotehnicii necesare pentru obţinerea acestei specii în culturi. În Polonia [24], [25], Ungaria [18] şi în România [35] se fac cercetări cu privire la aclimatizarea acestei specii în vederea obţinerii materiei prime medicamentoase.

Extinderea culturilor de *Vinca rosea* L. în alte zone ale globului decît cele de origine ridică o serie de probleme noi, legate de sensibilitatea acestei plante la infecţia cu unii agenţi patogeni, în special cu virusuri.

Se ştie că *Vinca rosea* L. serveşte în cercetările experimentale de laborator ca plantă test pentru identificarea virusurilor de tipul „aster yellows" [26], [43], [44]. Apariţia unor astfel de boli virotice pe *Vinca rosea* L. cultivată în cîmp a fost semnalată de Maramorosch [27], care izolează din culturile acestei specii din Mexic un virus capabil să producă fenomene tipice de îngălbenire.

Recent, prin cercetările făcute în laboratorul de virusuri şi bacterii, al Institutului de biologie „Traian Săvulescu" de către unul din autorii prezentei lucrări, s-a reuşit de asemenea să se izoleze din culturile de *Vinca rosea* L. din România un virus de tip „aster yellows" [36]. Din observaţiile de teren, precum şi din cercetările experimentale de seră, efectuate cu ocazia izolării acestui virus, s-a ajuns la concluzia că virusul afectează în cîmp peste 90% din plantele cultivate, producînd fenomene de îngălbenire, filodie, proliferarea florilor şi sterilitate şi este transmisibil prin cicade (fig. 1 şi 2).

Ţinînd seama de acest fapt, am considerat necesar să studiem în ce măsură infecţia virotică influenţează cantitatea şi calitatea conţinutului în alcaloizi din această plantă, în scopul stabilirii acţiunii pe care aceasta o poate avea asupra valorii plantelor de *Vinca rosea* L., materia primă medicamentoasă pentru obţinerea diverşilor alcaloizi ; şi să urmărim dacă în rădăcinile plantelor bolnave se găseşte sau nu un conţinut sporit de vincaleucoblastină, alcaloidul de bază cu acţiune anticanceroasă.

MATERIAL ŞI METODE

Plantele au fost crescute în condiţii de seră la temperatura de 22—24°, umiditatea atmosferică de 70—80% şi luminozitate de 16 ore, suplimentată prin lumină fluorescentă. Infectarea s-a făcut prin altoiri şi grefe de ţesut, cînd plantele aveau 4 luni. Extracţia alcaloizilor s-a făcut la 9 luni de la infecţie şi după ce plantele au atins vîrsta de 13 luni. La această vîrstă, plantele sănătoase aveau înălţimea de 70—80 cm şi grosimea tulpinii la colet de 1 cm. Plantele infectate de aceeaşi vîrstă aveau înălţimea medie de 20—30 cm, erau deformate puternic şi cu sistemul radicular mult redus.

Materialul de cercetare, constituit din plante sănătoase şi bolnave, a fost colectat la data de 1.XI.1964, selecţionat pe organe vegetative (rădăcini, tulpini, frunze) şi uscat într-un pod bine aerisit. Mărunţirea fiecărui organ în parte s-a făcut la moara electrică.

Pentru determinarea conţinutului în alcaloizi s-au luat 2 g de produs vegetal, s-a extras cu o soluţie de acid formic 5% (500 ml) timp de 30 min, la vibroextractorul F.S., construit de Ionescu-Stoian şi colab. [17]. Soluţia extractivă s-a filtrat şi s-a distilat sub presiune redusă pînă la un volum de circa 10 ml, s-a alcalinizat cu hidroxid de sodiu 30% şi s-a extras de trei ori cu cîte 50 ml cloroform. Soluţia cloroformică s-a distilat sub presiune redusă la volum mic, s-au adăugat 3 ml acid formic 30% şi s-au îndepărtat urmele de cloroform. După filtrare, alcaloizii au fost precipitaţi cu reactivul Bertrand. Totalul de alcaloizi a fost exprimat în yohimbină.

Pentru examenul cromatografic, s-au luat 10 g de produs vegetal şi s-au supus vibroextracţiei cu o soluţie de acid formic 5% (500 ml), timp de 30 min. După filtrare, soluţia s-a concentrat sub presiune redusă pînă la un volum de circa 10 ml, s-a tratat cu hidroxid de sodiu 30% pînă la pH 10 (indicator universal) şi s-a extras cu cloroform în repetate rînduri. Soluţia cloroformică s-a concentrat sub presiune redusă, iar reziduul a fost luat cu

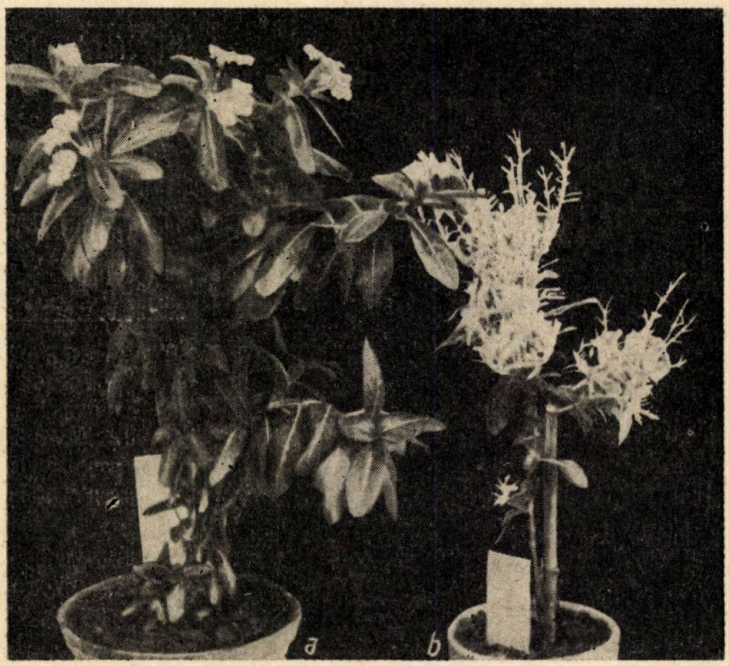


Fig. 1. — *Vinca rosea* L., exemplare de aceeaşi vîrstă (13 luni). *a* — exemplar sănătos ; *b* — exemplar infectat cu virus, după 9 luni de la infecţie.

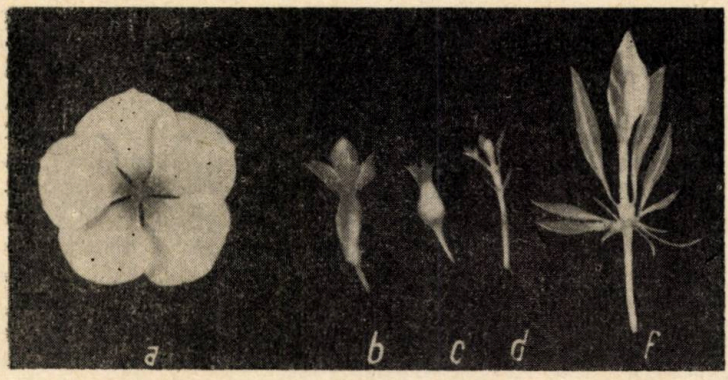


Fig. 2. — *a* — Floare normală de *Vinca rosea* L ; *b*, *c*, *d*, *e* — metamorfoza retrogradă a florii. În *c* se observă proliferarea elementelor florale (petale, pistil şi stamine) în frunzuliţe.

circa 10 ml de soluţie de acid formic 50%. După alcalinizare cu hidroxid de sodiu 30% pînă la pH 10, s-a extras cu cloroform. Soluţia cloroformică s-a concentrat sub presiune redusă pînă la circa 5 ml şi a servit la examenul cromatografic.

Pentru separarea cromatografică a alcaloizilor s-a folosit tehnica cromatografică ascendentă pe hîrtie Whatman nr. 1, în aparatul de cromatografie „Chropa".

Ca sisteme de solvenţi le-am folosit pe acelea cu formamidă [15], [3], [42], sau propilen-glicol [32], ca fază staţionară, deoarece s-au dovedit cele mai avantajoase. Ca fază mobilă am întrebuinţat următoarele sisteme de solvenţi: I) benzen-ciclohexan (1 : 1); II) izooctan-benzen-formamidă (100 :50 :5); III) benzencloroform (1 :1); IV) eter-benzen (1 :10) saturat cu formamidă [42]. Dintre acestea, cel mai bun sistem de solvenţi s-a dovedit ultimul propus de Szász şi colab. [42], pe care l-am adaptat condiţiilor noastre de lucru.

Benzile de hîrtie (49×9 cm) au fost impregnate cu formamidă prin cufundare timp de 10 min în acetonă cu 20% formamidă, apoi au fost ţinute în aer pînă la îndepărtarea acetonei. Extractele cloroformice de analizat şi probele martor de δ-yohimbină şi vincaleucoblastină sau micropipetat pe linia de start trasă cu creionul la 4 cm de la marginea hîrtiei.

Ca fază mobilă s-a folosit un amestec de eterbenzen (1 :10) saturat cu formamidă adusă la pH 5 cu acid formic anhidru. Timpul de expunere cromatografică a fost de 100 min la temperatura camerei, după care cromatogramele au fost ţinute 15 min într-o atmosferă de clor*. După oxidare, cromatogramele s-au uscat la aer şi s-au cercetat în lumină ultravioletă.

Punerea în evidenţă a alcaloizilor s-a făcut în lumina ultravioletă şi cu reactivul Dragendarff modificat [14].

De asemenea, pentru separarea cromatografică a alcaloizilor şi verificarea rezultatelor am folosit şi metoda cromatografică în strat subţire, propusă de Ivánovics şi colab. [18].

Vincaleucoblastina şi δ-yohimbina, folosite ca martor în cercetările cromatografice amintite, au fost preparate de noi din rădăcinile de *Vinca rosea* L., după metoda indicată de Svoboda şi colab. [41]. Vincaleucoblastina izolată de noi, supusă cercetărilor fizico-chimice amănunţite (analiza elementară, punct de topire, $(\alpha)_D$ etc.), a corespuns întru totul datelor din literatură.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Determinările cantitative ale conţinutului de alcaloizi, efectuate asupra organelor vegetative de *Vinca rosea* L. (rădăcini, tulpini, frunze), provenite atît de la plantele sănătoase, cît şi de la cele infectate sînt cuprinse în tabela nr. 1, din care reiese că : *a*) conţinutul în alcaloizi al frunzelor provenite de la plantele infectate este redus la urme; *b*) tulpinile şi rădăcinile plantelor infectate au un conţinut în alcaloizi mai mare decît acela al tulpinilor şi rădăcinilor provenite de la plantele sănătoase.

Prin cromatografia ascendentă pe hîrtie am obţinut spectre cromatografice ale rădăcinilor şi frunzelor sănătoase de la *Vinca rosea* L., alcătuite fiecare din 7 spoturi alcaloidice. Dintre acestea, am putut identifica, după fluorescenţă şi valoare Rf, δ-yohimbina şi vincaleucoblastina, pentru care am avut substanţe martor. Spotul vincaleucoblastinei apare de culoare roşie-cărămizie chiar la lumina naturală. În cazul rădăcinilor

* Atmosferă de clor s-a preparat din 50 ml de permanganat de potasiu, care s-au adăugat peste 50 ml de acid clorhidric 10%. Operaţia s-a făcut într-un vas de sticlă închis.

Tabela nr. 1

Determinarea cantitativă a conţinutului în alcaloizi totali* din unele organe ale plantei *Vinca rosea*. L. cultivată în seră

Produsul vegetal	Proveniența	Conţinut în alcaloizi (%)**
Frunze	Plante sănătoase	0,56
Frunze	„ infectate	urme
Tulpini	„ sănătoase	0,25
Tulpini	„ infectate	0,32
Rădăcini	„ sănătoase	1,29
Rădăcini	„ infectate	3,42

* Pentru fiecare organ vegetal s-au făcut cel puţin 5 determinări cantitative.
** Conţinutul în alcaloizi a fost exprimat în yohimbină.

plantelor infectate, spectrul cromatografic a cuprins însă numai 6 spoturi alcaloidice, dintre care spotul δ-yohimbinei s-a dovedit în cantitatea cea mai mare, şi totodată s-a constatat lipsa vincaleucoblastinei (fig. 3).

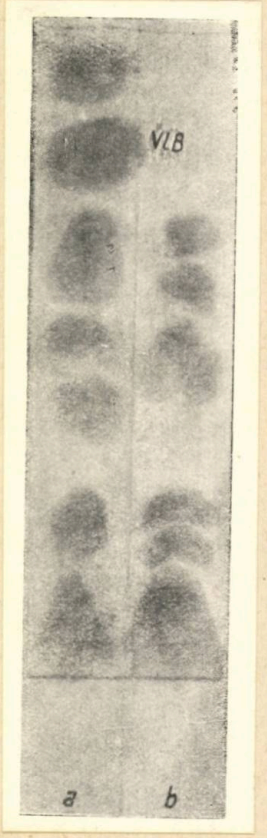


Fig. 3. — *a* — cromatograma alcaloizilor din rădăcinile de *Vinca rosea* L. sănătoasă; primul şi al şaselea spot alcaloidic au aceeaşi valoare Rf ca yohimbina, respectiv vincaleucoblastina (VLB), folosite ca martor; *b* — cromatograma alcaloizilor din rădăcinile aceleiaşi specii infectate cu virus (se observă lipsa vincaleucoblastinei).

De asemenea, şi prin metoda cromatografică în strat subţire [18] am obţinut din rădăcinile şi frunzele de *Vinca rosea* L. sănătoasă un spot alcaloidic roşu-cărămiziu şi la lumina naturală, corespunzător ca valoare Rf alcaloidului vincaleucoblastina martor.

Din cercetările noastre rezultă că infecţia virotică duce, pe de o parte, la o creştere a conţinutului de alcaloizi totali în rădăcini, iar pe de altă parte împiedică procesele de biosinteză a vincaleucoblastinei.

Cantitatea mare de alcaloizi în rădăcina plantei bolnave confirmă şi la *Vinca rosea* L. cele afirmate la alte specii de plante sănătoase de către Mothes [29—31], ca şi de alţi autori [28], că alcaloizii au locul principal de formare în rădăcini, şi nu în frunze. În sprijinul acestei afirmaţii este şi faptul constatat de noi că plantele infectate au aparatul foliar mult redus şi clorozat.

Dat fiind că în cazul infecţiilor virotice la plante, ca şi la animale, metabolismul este deviat de la normal, iar procesele de sinteză proteinică şi nucleinică, precum şi activitatea unor enzime sînt mult intensificate [23], [13], [47], [19], creşterea conţinutului în alcaloizi apare explicabilă.

Pe fondul general al proceselor metabolice alterate, căile obişnuite de formare a vincaleucoblastinei sînt probabil întrerupte prin blocarea unei enzime, care catalizează sinteza vincaleucoblastinei, produs macromolecular, cu structura cea mai complexă dintre alcaloizii din *Vinca rosea* L. Explicaţiile proceselor intime care au loc în timpul infecţiei virotice, corelate cu diferite verigi de sinteză a alcaloizilor din *Vinca rosea* L. în general, şi a celor antitumorali în special, constituie o preocupare a noastră în prezent, cu atît mai mult cu cît nu există o explicaţie a etapelor intermediare de biosinteză a alcaloizilor la plante.

CONCLUZII

Plantele de *Vinca rosea* L. infectate cu virus de tipul „aster yellows" au în frunze un conţinut redus de alcaloizi (urme), pe cînd în rădăcini conţinutul în alcaloizi creşte, fiind de peste două ori mai mare decît în rădăcinile plantelor sănătoase.

Infecţia virotică provoacă, totodată, şi o modificare calitativă a compoziţiei alcaloizilor, şi mai ales împiedicarea biosintezei vincaleucoblastinei, principiul activ de bază cu acţiune anticanceroasă din *Vinca rosea* L.

Prezentată la redacţie
la 4 mai 1965

Facultatea de farmacie I. M. F., Bucureşti şi Institutul de biologie „Traian Săvulescu" al Academiei R. S. România, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Armstrong I. G., Dyke R. W., *Hodgkin's disease and other tumors treated with vinblastine (V.L.B.) sulfate*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **2**, 206 (1961).
2. Armstrong I. G., Dyke R. W., Fouts P. Y., *Initial clinical experince with leurocristine, a new alkaloid from Vinca rosea L.*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **3**, 301 (1962).
3. Banes D., Carol J., Wolff Y., *The Chromatografic Analysis of Reserpine Preparations*, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., **44**, 640 (1955).

4. Beer C. T., *The leukopenic action of extracts of Vinca rosea L.*, Britisch Empire Cancer Compaign, 33 rd., Annual Report, 1955, p. 487.
5. Bohannon R. A., Miller D. G., Diamond H. D., *Leurocristine in the treatment of lymphomas and leukemias*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **3**, 305 (1962).
6. Carbone P., Brindley C. O., *Clinical studies with leurocristine*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **3**, 309 (1962).
7. Costa G., Gailani S., Holland J. F., *Clinical studies with leurocristine*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **3**, 312 (1962).
8. Cutts J. H., Beer C. T., Noble R. L., *Effects on hematopoesis in rats of extracts of Vinca rosea*, Rev. Canad. Biol., **16**, 476 (1957).
9. Cutts J. H., Beer C. T., Noble R. L., *Biological Properties of Vincaleukoblastine an Alkaloid in Vinca rosea L. with Reference to Its Antitumor Action*, Cancer Research, **20**, 1 023 (1960).
10. Forst J. W., Goldwein M. I., Bryan J. A., *Clinical Experience with Vincaleukoblastine in Far-Advanced Hodgkin's Disease and various Malignant States*, Ann. Int. Med., **56**, 854 (1962).
11. Greshoff M., *Mittheilungen aus dem chemisch-pharmakologischen Laboratorium des botanischen Gartens zu Buitenzorg (Jawa)*, Ber. deut. chem. Ges., **23**, 3 544 (1890).
12. Hertz R., Lipsett M. B., Moy R. H., *Effect of V.L.B. on Metastatic choriocarcinoma and Related Trophoblastic Tumors in Women*, Cancer Research, **20**, 1 050 (1960).
13. Herzmann H., *Biochemische Untersuchungen über den Stoffwchsel gesunder und brennfleckenkranker Bohnen. I. Untersuchungen über Kohlenhydrate, Stickstoffverbindungen, Carbonsauren und einige Oxydationsenzyme*, Phytopath. Zeitsch., **33**, 349 (1958).
14. Hais I., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1960, p. 748.
15. Hochstein F. A., Murai K., Boegemann W. H., *Alkaloid of Rauwolfia heterophylla*, J. Am. Chem. Soc., **77**, 3 551 (1955).
16. Hodes M. E., Rohn R. J., Bond W. H., *Vincaleukoblastine Preliminiary Clinical Studies*, Cancer Research, **20**, 1 041 (1960).
17. Ionescu-Stoian P., Fait I., Stanciu N., Savopol E., Cruceanu I., *Die Mechanisierung von Arbeitsverfahren in der Apotheke. 3 Mitteilung: Die Vibroextraction, Ein Verfahren zur Herstellung wässriger Extraktlösungen*, Die Pharmazie, **16**, 122 (1961).
18. Ivánovics K., Márk G., Hörömpö L., Szász K., *A rózsmeténg (Catharanthus roseus G. Don seu Vinca rosea L. seu Lochnera rosea Reichb) citosztatikus fratóanyagainak viszgálata*, Acta Pharmaceutica Hungarica, **34**, 36 (1964).
19. Jermoljev E., *Determination of yelow virus in leaves and roots of the Sugar beet by biochemical methods*, Proceedings of the Sth Conference of the Czechoslovak Plant virologists, Prague, 1962.
20. Johnson I. S., Wright H. E., Svoboda G. H., *Experimental basis for clinical evaluation of antitumor principles derived from Vinca rosea L.*, J. Lab. Clin. Med., **53**, 830 (1959).
21. Johnson I. S., Howard F. W., Svoboda G. H., Vlantis J., *Antitumor Principles derived from Vinca rosea L.*, Cancer Research, **20**, 1 016 (1960).
22. Karon M., *Leurocristine sulfate in the treatment of acute leukemia*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **3**, 333 (1962).
23. Kegler H., Opel H., Herzmann H., *Untersuchungen über Virosen des Kernobstes. III. Zur Histologie und Physiologie Steinfrüchtiger*, Phytopath. Zeitsch, **41**, 42 (1961).
24. Kohlmünzer S., *Badania nad alkaloidami z Vinca rosea L.*, Dissertationes Pharmaceuticae, **10**, 115 (1958).
25. Kohlmünzer S., Krupińska J., *Izolowanie Δ-Johimbiny (Ajmalicyny) Z Korzeni Vinca rosea L. I, niektóre jej wlasności Farmakologiezne*, Dissertationes Pharm., **12**, 85 (1960).
26. Kunkel V. L., *Studies on aster yellows*, Am. J. Botany, **13**, 646 (1926).
27. Maramorosch K., *Vinca yellows in Mexico*, Plant disease Reporter, **40**, 1 104 (1956)
28. Moritz O., *Einführung in die allgemeine Pharmakognosie*, Jena, 1961, p. 33.
29. Mothes K., *Über neue Arbeiten zur Biosynthese der Alkaloide*, Die Pharmazie, **14**, 121 (1959).
30. Mothes K., *Über neue Arbeiten zur Biosynthese der Alkaloide*, Die Pharmazie, **14**, 177 (1959).
31. Mothes K., *Physiology of Alkaloids*, J. Pharmacol., **XI**, 193 (1959).

32. Mc. Mullen W. H., Pazdera H. J., Missan L. L., Ciaccio L. L., Grenfell T. C., *Analytical Metods for Reserpine*, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., **44**, 446 (1955).
33. Noble R. L., Beer C. T., Cutts J. H., *Role of chance observations in chemotherapy Vinca rosea L.*, Ann. N.Y. Acad. Sc., **76**, 882 (1958).
34. Noble R. L., Beer C. T., Cutts J. H., *Further biological activities of vincaleukoblastine an alkaloid izolated from Vinca rosea L.*, Biochem. Pharmacol., **16**, 476 (1958).
35. Pavel M., Grinţescu A., *Realizări obţinute la staţiunea experimentală de plante medicinale Domneşti*, Conferinţa naţională de farmacie, Bucureşti, 1963, p. 56.
36. Ploaie Gh. P., *Izolarea unui virus de tip „aster yellows" din culturile de Vinca rosea L. cultivată în România*, Ses. ştiinţ. a Inst. de biologie, Bucureşti,1965.
37. Rohn R. J., Hodes M. E., *Some effects of intravenously given leurocristine*, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **3**, 355 (1962).
38. Svoboda G. H., *A note on several new alkaloids from Vinca rosea L. Leurosine, virosine, perivine*, J. Am. Pharm. Assoc., **47**, 834 (1958).
39. Svoboda G. H., Neuss N., Gorman M., *Alkaloids of Vinca rosea L. V. Preparation and Characterization of Alkaloids*, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., **48**, 659 (1959).
40. Svoboda G. H., Barnes A. J. Jr., *Alkaloids of Vinca rosea L. XXIV. Vinaspine, Vincathicine, Rovidine, Desacetyl V.L.B. and Vinaphamine*, J. Pharm. Sci., **53**, 1 227 (1964).
41. Svoboda G. H., Oliver A. T., Bedwell D. R., *Alkaloids of Vinca rosea L. (Cathapanthus roseus G. Don). XIX. Extraction and characterization of Root Alkaloids*,Pharm., **26**, 141 (1963).
42. Szász K., Kováts T., Karácsony M. E., Lörinez Cs., Bayer J., *Über die Alkaloide von immergrün Vinca minor L. II. Die Quantitative Bestimmung und papierchromatographische Trennung der Alkaloide*, Planta Medica **7**, 234 (1959).
43. Valenta V., Musil M., Misiga S., *Investigations on European yellows type Virusés I. The Stolbur virus*, Phytopath. Zeitsch. **42**, 1 (1961).
44. Valenta V., Musil M., *Investigation on European yellows — type Viruses. II. The Clover Dwarf and Parastolbur Viruses*, Phytopath. Zeitsch., **47**, 38 (1963).
45. Varwick O. H., Darte J. M. M., Brown T. C., *Some biological effects of Vincaleukoblastine, an Alkaloid in Vinca rosea L. in Patients with Malignant Disease*, Cancer, Research, **20**, 1 032 (1960).
46. Wright T. L., Hurley J., Korst D. R., Monto R. W., Rhon R. J., Vill J. J., Louis J., *Vincablastine (Vinblastine) in Neoplasic Disease*, Cancer Research, **23**, 169 (1963).
47. Van Kammen A., Brouwer D., *Increase of polyphenoloxidase activity by a local virus infection in uninoculated part of leaves*, Virology, **22**, 9 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 465–471 (1965)

STUDIUL REPARTIȚIEI ^{65}Zn ÎN FRACȚIUNILE PROTEICE ALE SERULUI DE COBAI

N. RACOVEANU, V. STĂNCULESCU și E. TRUȚA

612.398 : 612.392.6

Rezumat. — S-a studiat repartiția ^{65}Zn între diversele fracțiuni proteice serice, la cobai, după 2 ore de la administrarea intraperitoneală a 5 μCi $^{65}ZnCl_2$.

Prin dializa serului față de un tampon TRIS pH 8,6 timp de 12 ore, nu s-a putut elibera zincul din complexul proteic. Aceeași stabilitate o arată și ^{65}Zn legat de proteinele solubile din hematii.

Prin cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză se constată legarea a aproximativ 25% din ^{65}Zn de fracțiunea α_2-globulinică. Electroforetic, se evidențiază legarea preponderentă a ^{65}Zn la α_1-globuline. Albuminele și α_2-globulinele au o afinitate aproape egală pentru zinc. Nu se constată legarea zincului de β-globuline și γ-globuline.

În complexitatea fenomenelor care guvernează repartizarea, depozitarea și eliminarea radionuclizilor din organism, un rol esențial și activ îl joacă transportul lor în torentul circulator. Cunoașterea detaliată a condițiilor de legare cu proteinele serice poate furniza o bază științifică pentru elaborarea unor metode eficiente de profilaxie și tratament în contaminarea radioactivă.

Dintre radionuclizii mai des utilizați, ne-a trezit interesul ^{65}Zn, pentru care, în sensul arătat mai sus, există relativ puține date în literatură, și acelea contradictorii.

Unele lucrări susțin că legarea și transportul zincului nu sînt condiționate de existența unui transportor proteic specific și că în vehicularea zincului ar fi interesate mai multe fracțiuni. Astfel, Vallee [1], ca și Okunewick și colab. [2], arată că, la cîine și șobolan, zincul este repartizat între toate fracțiunile proteice, procentul cel mai mare revenind albuminelor. În studii radioelectroforetice pe ser de om, Vessel și colab. [3] găsesc că zincul se repartizează între albumine și α_2-globuline, în timp ce Mary Jean Long [4] demonstrează legarea zincului numai de fracțiunile α-globulinice.

Ne-am propus în lucrarea de față să studiem, în prima fază, repartizarea ^{65}Zn între diferitele fracțiuni proteice din ser, iar în a doua fază repartiția în diferitele organe a ^{65}Zn legat proteic.

MATERIAL ŞI METODĂ

La 5 cobai cu greutăţi cuprinse între 700 şi 800 g s-au administrat intraperitoneal 5 μCi de ^{65}Zn, sub formă de $^{65}ZnCl_2$, într-un volum de 2 ml. După 2 ore s-au prelevat probe de sînge prin puncţionarea cordului. Sîngele a fost lăsat să coaguleze timp de 1 oră la temperatura camerei, apoi a fost centrifugat pentru separarea serului. Serul a fost dializat într-un sac de celofan, timp de 12 ore la 4 °C, faţă de tamponul iniţial (vezi mai jos), cu un raport de volume faţă de dializant de 1 : 20, apoi centrifugat, fracţionat cromatografic pe coloană de DEAE-celuloză şi analizat electroforetic.

Cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză. S-a lucrat pe DEAE-celuloză Manex. Adsorbantul, după spălări succesive cu NaOH 1 N, apă distilată şi decantarea părţilor nesedimentabile, a fost reluat de cîteva ori în tampon iniţial şi adus la pH-ul acestuia. El a fost turnat apoi sub formă de terci într-o coloană hidrostatică de 1 m înălţime, umplută cu tampon iniţial şi conectată la coloana cromatografică. Adsorbantul s-a sedimentat liber, prin forţa gravitaţională, sub presiunea acestei coloane de lichid. Peste noapte, DEAE-celuloza s-a echilibrat cu aproximativ 1 l tampon iniţial. Pentru umplerea coloanei cromatografice, de dimensiunile 1×10 cm, au fost necesare aproximativ 1,5 g DEAE-celuloză.

1 ml din serul dializat a fost pipetat în coloană, spălat cu tampon iniţial şi apoi eluat continuu într-un gradient de concentraţie şi pH. Drept tampon iniţial s-a folosit fosfat 0,005 M cu TRIS 0,04 M, pH 8,6, iar tamponul final TRIS H_2PO_4 0,35 M, pH 4,5 [5]. În ambele tampoane s-a evitat sodiul, plecînd pentru realizarea concentraţiilor dorite de la acid fosforic şi TRIS.

Gradientul, de tip convex, a fost realizat prin intermediul a 3 vase în serie, 2 erlenmeyere de 50 ml cu tampon final şi un balon de 100 ml cu tampon iniţial, folosit drept cameră de amestec.

Efluentul a fost colectat în volume de cîte 3 ml, în eprubete gradate, cu o viteză de aproximativ 15 ml pe oră, la temperatura camerei. Radioactivitatea din fracţiunile colectate s-a măsurat cu un detector de scintilaţie cu cristal NaI (Tl) 2″×2′, cu puţ (Frieseke-Hoepfner). Extincţiile proteinelor s-au determinat spectrofotometric la 280 m μ şi ale zincului la 328 mμ, cu un spectrofotometru Hitachi.

Electroforeza. Volumul de efluent corespunzător maximului de activitate, care a coincis şi cu un maxim proteic net, s-a dializat faţă de apa distilată, timp de cîteva ore, la temperatura camerei, apoi s-a liofilizat. Liofilizatul a fost reluat într-un volum bine definit de apă distilată, pentru a se realiza o concentraţie apropiată de a proteinelor serice, apoi s-a analizat electroforetic, pe hîrtie, comparativ cu serul iniţial.

S-a lucrat în tampon borat cu adaos de fosfat disodic, la pH 8,6 [6], pe hîrtie de filtru Arches 304, la un potenţial de 3,5 v/cm, cu un aparat Spinco cu sistem de benzi atîrnate. Timpul de migrare a fost de 30 de ore la 4 °C. Developarea electroforegramelor s-a făcut cu Amidoschwarz 10 B, iar evaluarea s-a făcut spectrofotometric, la 580 m μ, prin eluarea fracţiunilor decupate în NaOH 0,1 N, după Wunderly [7].

Pentru a stabili care din fracţiunile electroforetice leagă ^{65}Zn, s-au migrat în paralel un număr de 7 electroforegrame, dintre care una a fost developată şi folosită drept ghid pentru decuparea zonelor corespunzătoare diferitelor fracţiuni de pe celelalte electroforegrame. Zonele identice au fost unite, pentru a se realiza o activitate mai mare, şi au fost măsurate la acelaşi detector de scintilaţie.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-a administrat practic aceeași cantitate de ^{65}Zn, iar prelevarea probelor de sînge s-a făcut după 2 ore în toate experiențele, totuși activitatea ^{65}Zn reținut în ser a variat în limite largi, dînd diferențe uneori de peste 60% între două experiențe.

Prin dializa serului la pH 8,6 se constată că ^{65}Zn nu traversează membrana de celofan. Fracționarea cromatografică pe coloană de DEAE celuloză și separarea electroforetică arată prezența ^{65}Zn în fracțiunile proteice obținute. Aceste fapte ne îndreptățesc supoziția că, în condițiile noastre experimentale, ^{65}Zn din ser se găsește legat în totalitatea sa de proteine.

Pentru a vedea care dintre fracțiunile proteice are o afinitate mai mare pentru legarea zincului, am urmărit paralelismul dintre fracțiunile proteice și radioactivitatea ^{65}Zn.

În figura 1 este reprezentată una dintre curbele de separare cromatografică pe DEAE-celuloză a serului de cobai după administrare de $^{65}ZnCl_2$. Am reprezentat grafic numai una dintre cele cinci experiențe efectuate, deoarece am obținut rezultate perfect reproductibile în ceea ce privește fracționarea proteinelor serice și distribuția radioactivității în aceste fracțiuni.

Din grafic se poate observa că :

a) curba radioactivității este urmărită destul de strîns de valorile găsite pentru extincțiile zincului ;

b) maximul de radioactivitate coincide cu maximul concentrației zincului determinat spectrofotometric și se situează în aria unui pisc proteic perfect delimitat ;

c) din raportul extincțiilor zincului și ale proteinelor (zona haşurată) se vede că concentrația cea mai mare de zinc pe proteină se realizează în zona aceluiași pisc proteic arătat mai sus.

Analiza electroforetică a efluentului corespunzător acestei zone arată existența a 3 fracțiuni proteice (fig. 2). Predomină α_2-globulinele, urmate de β-globuline și de urme de γ-globuline.

Separarea electroforetică arată că aproximativ 80% din activitatea ^{65}Zn se repartizează egal între albumine și α_1-globuline, α_2-globulinelor revenindu-le restul (fig. 3). Activitatea foarte scăzută a β-globulinelor (2%) o punem mai degrabă pe seama contaminării hîrtiei prin adsorbție, zona respectivă coincizînd cu punctul de start, decît pe seama unei reale legături a zincului de această fracțiune proteică.

Pornind de la distribuția procentuală a fracțiunilor serice separate electroforetic, s-a calculat activitatea corespunzătoare unei cantități date de proteină (activitatea specifică) pentru fiecare fracțiune în parte, iar din compararea rezultatelor astfel obținute, luînd arbitrar albuminele drept referință, se poate vedea, după cum rezultă din figura 4, că cea mai mare afinitate pentru zinc o prezintă α_1-globulinele, urmate de α_2-globuline și albumine.

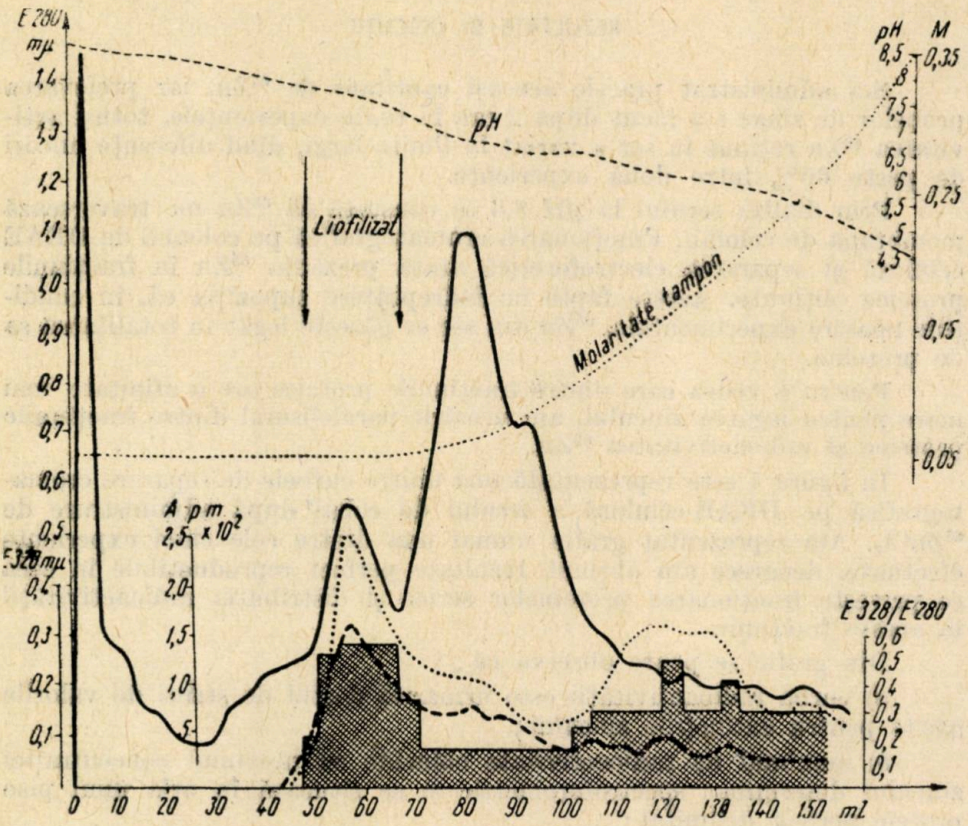


Fig. 1. — Separarea serului de cobai pe coloană de DEAE-celuloză. Coloană de 1×10 cm, 1 ml ser, tampon fosfat-TRIS, gradient con-sferă în trepte.

curba de extincţie a proteinelor la 280 mμ
radioactivitatea efluentului (^{65}Zn)
curba de extincţie a Zn la 328 mμ
măsura raportului dintre extincţia Zn şi extincţia proteinelor.
La partea superioară a graficului sînt reprezentaţi parametrii de lucru (gradientul de pH şi molaritate).

La prima vedere ar apărea un dezacord între rezultatele obţinute prin cromatografie şi cele obţinute prin electroforeză în ceea ce priveşte afinitatea α_1-globulinelor şi albuminelor pentru zinc.

Deoarece s-a liofilizat şi cercetat electroforetic numai o porţiune determinată din efluentul colectat, care corespunde unui pisc proteic şi radioactiv net delimitat, nu dispunem de informaţii asupra compoziţiei în proteine serice a restului efluentului pentru care spectrofotometric şi radiometric există evidenţa unor fracţiuni proteice.

Electroforetic s-a văzut că radioactivitatea β-globulinelor este practic nulă; rezultă că activitatea piscului obţinut cromatografic, care reprezintă fracţiunea distinctă cu cea mai mare radioactivitate, cores-

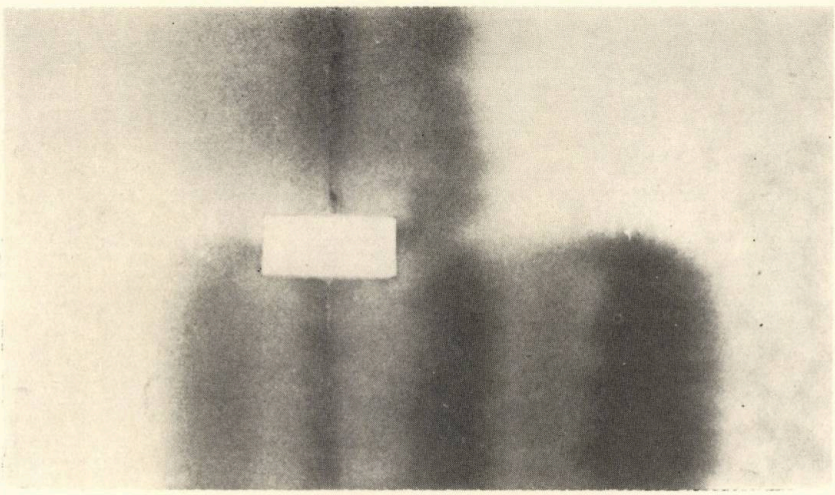


Fig. 2. — Electroforegrama serului de cobai şi a liofilizatului din fracţiunea separată pe DEAE-celuloză.

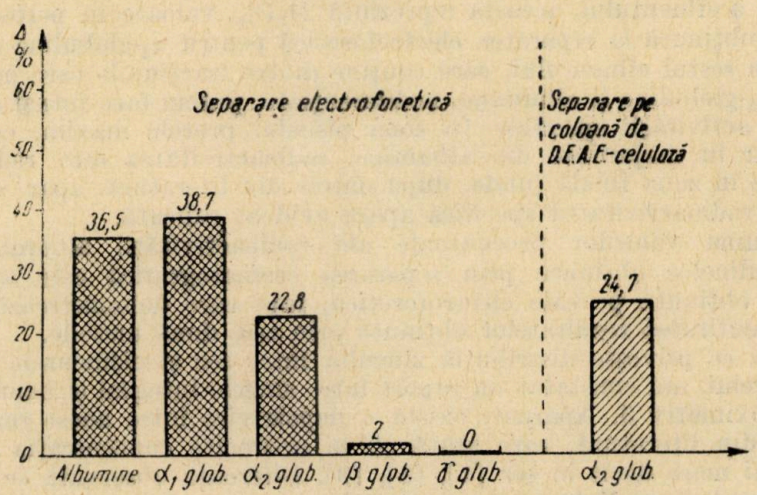


Fig. 3. — Repartizarea procentuală a activității ^{65}Zn pe fracțiunile proteice serice.

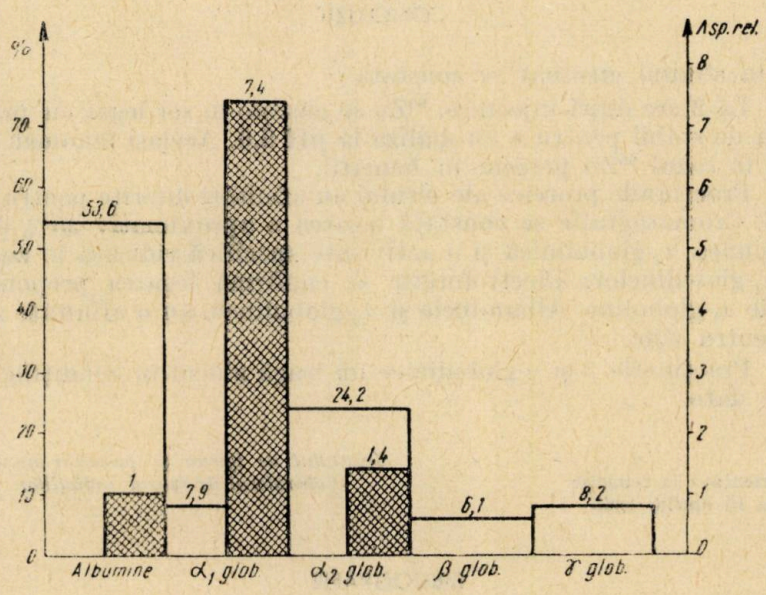


Fig. 4. — ☐ Distribuția procentuală a fracțiunilor proteice din ser.

▨ Compararea activității specifice a diferitelor fracțiuni față de albumine

punde α_2-globulinelor. Transpusă procentual faţă de radioactivitatea globală a efluentului, aceasta reprezintă 24,7%, valoare în perfect acord cu cea obţinută la separarea electroforetică pentru α_2-globuline (22,8%).

În restul efluentului, care conţine dintre fracţiunile care ne interesează α_1-globuline şi albumine, nediferenţiate, putem face totuşi aprecieri asupra activităţii specifice. În zona piscului proteic maxim, constituit de sigur în majoritate din albumine, radioactivitatea este redusă, în timp ce în zona finală (unde, după datele din literatură, apar α_1-globulinele), radioactivitatea specifică apare evident ridicată.

Suma valorilor procentuale ale radioactivităţii albuminelor şi α_1-globulinelor obţinută prin separarea cromatografică este apropiată de cea obţinută pe cale electroforetică, fapt care demonstrează încă o dată identitatea rezultatelor obţinute prin cele două metode.

În ce priveşte distribuţia zincului între ser şi elementele figurate ale sîngelui, am constatat un raport între sînge integral şi hematii egal cu aproximativ 3. Aparent, există o nepotrivire între acest rezultat şi datele din literatură, care arată că în eritrocite concentraţia zincului este mai mare decît în ser [1], [8], [9]. Diferenţa observată se explică prin faptul că studiul nostru se referă la repartiţia zincului la 2 ore după administrare, adică înainte de atingerea echilibrului în organism, care se produce după 10 ore.

CONCLUZII

Din studiul efectuat se constată :

1. La 2 ore după injectare, ^{65}Zn se găseşte în ser legat cu proteinele suficient de stabil pentru a nu dializa la pH 8,6. Acelaşi fenomen se constată şi în cazul ^{65}Zn prezent în hematii.

2. Fracţiunile proteice ale serului au afinităţi diferite pentru legarea zincului. Cromatografic se constată legarea a aproximativ 25% din ^{65}Zn de fracţiunea α_2-globulinică şi o activitate specifică ridicată în zona atribuită α_1-globulinelor. Electroforetic se confirmă legarea preponderentă a ^{65}Zn de α_1-globuline. Albuminele şi α_2-globulinele au o afinitate aproape egală pentru zinc.

3. Fracţiunile β şi γ-globulinice nu leagă zincul în condiţiile experimentale date.

Prezentată la redacţie
la 10 aprilie 1965

Institutul de igienă şi protecţia muncii,
Laboratorul de igiena radiaţiilor

BIBLIOGRAFIE

1. Vallee B. L., Zinc, în Comar C. L., Bronner F., *Mineral Metabolism. An Advanced Treatise*, vol. 2, part B, Academic Press, New York, 1962.
2. Okunewick J. P., Schjeide O. A., Carlsen E. N., Hennessy T. G., *Distribution of ^{65}Zn in Rat P.asma*, U.S. At. Energy Comm. UCLA–506, 1962.

3. Vessel E. S., Bearn A. G., *Localization of Lactic Acid Dehydrogenase Activity in Serum Fractions*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **94**, 96 (1957).
4. Mary Jean Long, *Metal Ion Analysis by Emission Spectroscopy of Starch Block Electrophoretically Separated Human Serum Proteins*, Am. J. Med. Technol., **28**, 241 (1962).
5. Peterson A. E., Wyckoff M. M., Sober H. A., *Gradient Chromatography of Human Serum Proteins and Its Application to the Examination of „Albumin" and „Globulin" Obtained by Ammonium Sulphate Fractionation*, Arch. Biochem. Biophys., **93**, 428 (1961).
6. Gheție V., *Mărirea capacității de rezoluție electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat*, St. cerc. biochim., **4**, 397 (1961).
7. Wunderly Ch., *Principles and Applications of Paper Electrophoresis*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1961.
8. Petrun N. M., Barcenko L. I., *Himiceskie vescestva v tkaniah i jidkostiah organizma celoveka*. Gos. Med. Izd. U.S.S.R., Kiev, 1961.
9. Puratic Solic O., Galarza Basanta A. M., Garcia del Amo C., Santos-Ruiz A., *Estudios metabólicos con cinc-65. IV. Datos sobre captación de este isotopos por los elementos sanguineos del perro*, Rev. Esp. Fisiol., **19**, 105 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 8, 4, 473—485 (1965)

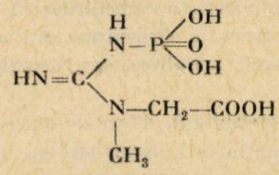
REFERAT GENERAL

ROLUL FOSFAGENULUI ÎN PROCESELE BIOCHIMICE CARE STAU LA BAZA FENOMENULUI DE CONTRACȚIE MUSCULARĂ

CORINA IORDACHE

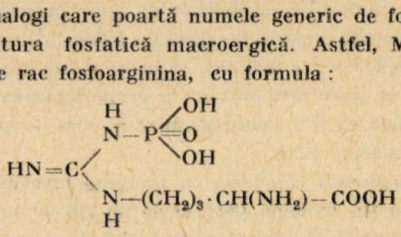
612.817.2

Cel mai important derivat de substituție al creatinei este fosfagenul (acid creatinfosforic, fosfocreatină sau fosforilcreatina), identificat în mușchi aproape concomitent de către Eggleton și Eggleton [1] și de Fiske și Subbarow [2]. Acest compus, cu formula :



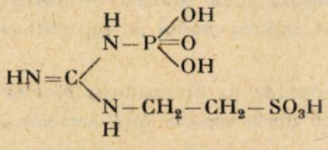
a fost izolat și purificat de Fiske și Subbarow [3], care au constatat că este o combinație în raport molar 1 : 1 între acidul fosforic și creatină.

În afara fosfagenului existent în mușchii vertebratelor, au mai fost descoperiți în decursul anilor o serie de compuși analogi care poartă numele generic de fosfageni, datorită faptului că molecula lor posedă legătura fosfatică macroergică. Astfel, Meyerhof și Lohmann [4] au descoperit în mușchiul de rac fosfoarginina, cu formula :

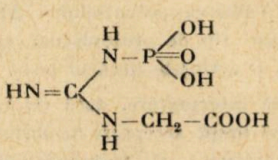


Acest fapt a determinat pe unii cercetători să caute dacă nu cumva în mușchii nevertebratelor există și alte guanidine substituite, cu rol de fosfageni. Aceasta cu atît mai mult cu cît cercetările lui Arnold și Luck [5] asupra conținutului în arginină al mușchilor de vertebrate și nevertebrate, ca și cele ale lui Kurtz și Luck [6] privitoare la existența la Annelide a unei alte guanidine fosforilate, dădeau unele indicații.

În 1953, Thoai, Roche, Robin și Thiem [7], [8] izolează din Arenicola marina și Nereis diversicolor compușii :

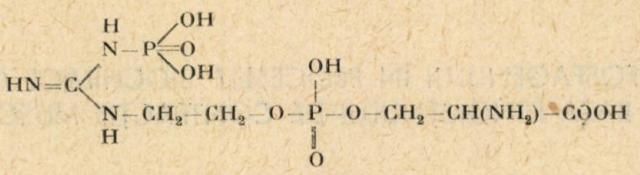


N-fosforil-taurociamina



N-fosforil-glicociamina

Același grup de cercetători izolează din *Lumbricus terrestris* [9] un alt fosfagen, cu formula :



N-fosforil-lombricina

Ca rezultat al studiilor de degradare făcute pe acest nou fosfagen, s-a constatat că el este un fosfodiester al guanido-etanolului și al serinei [10]. Acest fosfagen se găsește în cantitate foarte mică, nu s-a putut izola ca un compus pur, dar baza lui este lombricina. Diferiți compuși guanidinici au fost astfel studiați în cursul anilor din multiple puncte de vedere [11—19].

În 1956, Roche și colab. [20] izolează din mușchiul de lipitoare (*Hirudo medicinalis*) un nou derivat guanidinic fosforilat, care corespunde formulei $C_{19}H_{22}O_{14}N_{11}$.

Discutînd repartiția naturală a guanidofosfaților și semnificația lor biologică, Thoai și Roche arată ca o concluzie provizorie a cercetărilor că nici un fosfagen nu caracterizează o clasă sau o familie definită de animale. Organisme care aparțin unor grupe zoologice foarte diferite pot să aibă același fosfagen, iar altele, care aparțin unor specii foarte învecinate, să aibă fosfageni distincți [21].

Compararea guanidinelor prezente în diferitele țesuturi ale aceluiași animal este și mai semnificativă. Organisme care conțin în mușchii lor sau în traiectul lor digestiv sau genital arginina sau o altă guanidină monosubstituită, posedă în spermatozoizii lor numai creatină. Astfel, de exemplu, prezența creatinei și a creatinfosfatului a fost semnalată de mult timp în spermatozoizii stelelor de mare, holoturiilor și anelidelor. Roche și Robin [22] au verificat existența creatinei în spermatozoizii animalelor ai căror mușchi conțin fie creatină, fie arginină, fie taurociamină. Cu toate acestea, creatina nu a fost întîlnită decît în elementele masculine flagelate ale organismelor citate mai sus, și nu în spermatozoizii amiboizi (*Maia*, *Ascaria*). Ea lipsește, de asemenea, la ouăle care provin din grupe zoologice foarte diverse (echinoderme, artropode, moluște, anelide), ca și în spermatozoizii în curs de involuție, care o conțin în mod normal atunci cînd sînt maturi [23].

Aceste rezultate sugerează concluzia că prezența creatinei și a fosfagenului corespondent este legată nu de un tip zoologic [24], ci de un tip de protoplasmă dotată cu o mobilitate particulară și care poate avea donatori de fosfat de un anumit nivel energetic.

Fosfagenii, a căror structură chimică și repartiție în regnul animal este diversă, prezintă un caracter comun : labilitatea legăturii lor amidice. La diversitatea structurilor și repartiției lor se opune pe plan enzimatic o specificitate strictă a transferazelor, cărora le servesc drept substrat fosfokinazele creatinei, argininei, glicociaminei, taurociaminei.

Semnificația biologică a unei astfel de diversități și a unei astfel de specificități ar trebui să fie căutată în randamentul energetic al degradării diferiților donatori de fosfat [25]. Valoarea potențialului ΔF_0 condiționează fără îndoială utilizarea fosfagenului de către fiecare tip de protoplasmă, și aceasta ar explica modul de repartiție a fosfagenilor după natura și cerințele fiecărui țesut [26—28].

Această interpretare, dată de Roche, nu exclude ca diversitatea bazelor guanidinice care pot servi drept acceptori de fosfat să traducă unele aspecte încă necunoscute — și fără îndoială adaptative — ale metabolismului azotat.

Din punct de vedere fizico-chimic, fosfagenul muscular a fost studiat prin izolarea sa din mușchi, analiza și sinteza sa. S-a cercetat de asemenea stabilitatea lui în stare solidă, în soluții, formarea de săruri, căldura și energia liberă a hidrolizei etc. Interesant de semnalat este faptul că instabilitatea fosfagenului se datorește prezenței în molecula sa a două fenomene care contribuie la reducerea considerabilă a posibilității de rezonanță [29]:

1. Dubla substituție a unui radical azotat prin două grupări $-CH_3$ și $-CH_2COOH$ foarte diferite de $-H$ din punct de vedere al puterii de atracție electronică,

2. Existența unei opoziții de rezonanță, la nivelul legăturii $-HN-P$ între cele două grupări guanidil și fosforil, o formă de rezonanță a uneia și a alteia cerînd aceluiași atom de N electronul necesar formării sistemelor de rezonanță independente.

Termenul de fosfagen a fost introdus de Eggleton și Eggleton, iar această denumire a fost apoi extinsă de alți cercetători asupra celorlalți derivați guanidinici fosforilați. Ennor și Morrison [30] sînt de părere că în cazul guanidinelor fosforilate, care conțin legătura N—P, și unde atomul de H al guanidinei $-NH_2$ este înlocuit cu gruparea fosforil $-P\begin{matrix}OH\\=O\\OH\end{matrix}$ și nu cu gruparea fosfat $O-P\begin{matrix}OH\\=O\\OH\end{matrix}$, ar trebui să se folosească prefixul „fosforil", și nu „fosfo". Corect s-ar spune atunci N-fosforil-creatina, în loc de fosfocreatină sau fosfagen.

Introducerea prefixului „fosforil" ar mai prezenta un avantaj în ceea ce privește distingerea enzimelor care intervin în transferul grupărilor fosfatice. De exemplu, pentru reacția enzimatică de transfer a grupării fosfatice în ecuația:

$$CP + ADP \rightleftharpoons ATP + \text{creatină}$$

se utilizează în prezent mai multe denumiri: creatinfosfokinaza, ADPcreatinfosfoferaza, fosfocreatinADPferaza, ATPcreatinfosfoferaza, creatinkinaza, ATPcreatintransfosfataza și ATPcreatintransfosforilaza. Adoptînd termenul propus de Ennor și Morrison, enzimele ar purta numele generic de „guanidinfosforiltransferaze", înlocuindu-se termenul guanidin general, cu acela al compusului care intervine în procesul studiat.

În ceea ce privește distribuția fosfagenului în organismul animal, Ennor și Rosenberg [31], studiind metodele de dozare a fosfagenului, au analizat și distribuția lui în țesuturile organismului animal. Acești autori au constatat că fosfagenul este prezent în toate țesuturile examinate. Mușchiul scheletic conține într-adevăr cea mai mare cantitate de fosfagen față de celelalte țesuturi. S-a constatat că aria de răspîndire a fosfagenului în organismul animal este mult mai mare decît se credea la început. Se pare, de altfel, că nivelul fosfagenului dintr-un țesut depinde de conținutul în creatină al țesutului respectiv. Părerea că prezența fosfagenului ar fi limitată numai la organele musculare și nervoase a dat naștere concepției după care aceste organe au nevoie de fosfagen pentru îndeplinirea funcțiunilor lor. Identificarea acestei substanțe și în alte organe, ca splina, ficatul și rinichii, înseamnă că și părerile asupra rolului fosfagenului trebuie modificate, deoarece asemenea organe nu au cerințe energetice atît de mari ca mușchiul scheletic și totuși conțin fosfagen.

Analiza conținutului de creatină și fosfagen în organele și țesuturile de broască (*Rana esculenta*) a arătat de asemenea că fosfagenul este prezent în toate țesuturile analizate (mușchi striați, netezi, creier, ficat, testicule, ovare, oase, plămîni, piele, rinichi și sînge) [32]. În mușchii croitori, fosfagenul constituie cam 50—60% din cantitatea totală de creatină, în plămîni cam 40%, iar în celelalte organe și mai puțin [33].

Dimpotrivă, Alecseeva şi Timofeeva [34], dozînd conţinutul de fosfagen al testiculelor de şobolani, cobai, iepuri şi pisici, nu au decelat prezenţa lui decît sub formă de urme la cobai.

Unii autori, ca Suzuki [35], au stabilit chiar şi ordinea în care fosfagenul se găseşte în diverse ţesuturi umane sau de cîine. Astfel, următoarele ţesuturi conţin cantităţi descrescînde de fosfagen : muşchi scheletic, vezica urinară, muşchi cardiac, creier, uter, ficat, splină, stomac, intestine, rinichi.

Aplicarea metodei cromatografice pe hîrtie pentru dozarea cantitativă a fosfagenului a dus la precizarea unor idei referitoare la participarea acestei substanţe în unele procese metabolice din organism. Astfel, Bistocchi [36], la analiza ficatului de cobai, remarcă faptul că datele din literatură nu reprezintă realitatea. Ficatul cobailor conţine cantităţi relativ mari de fosfagen şi creatină, care depăşesc cu mult atît valorile publicate de alţi autori, cît şi conţinutul de fosfagen din muşchi şi creier. De aceea, Bistocchi dezminte ipotezele anterioare că fosfagenul şi creatina ar fi substanţe specifice ţesutului muscular sau nervos şi că distribuţia fosfagenului în organe ar fi în funcţie de necesităţile lor fiziologice.

Contrar acestor păreri, în aceeaşi perioadă apare o lucrare semnată de Gerlach şi Janke [37], care, folosind tot metoda cromatografică, ajung la alte constatări. După ei, organele excitabile ca muşchiul scheletic, muşchiul cardiac, creierul şi mucoasa intestinală conţin cele mai mari cantităţi de fosfagen. O cantitate mai mică se găseşte în rinichi, iar în ficat există doar urme.

Se poate deci trage concluzia că fosfagenul nu este o substanţă exclusivă muşchiului, ea găsindu-se şi în alte organe, în cantitate mai mică. O sinteză a datelor privind distribuţia fosfagenului la diferite animale şi în diferiţi muşchi este redată în tabelele 1 şi 2.

Tabela nr. 1

Fosfagenul din muşchiul striat al diferitelor animale (38) în mg creatină/100 g ţesut

Specia	Varietatea muşchilor	Limitele extreme	Media
Om	scheletici	211—239	221
Pisică	„	215—363	
Cîine	„	—	170
Iepure	„	273—463	372
Broască	„	119—183	158
Cobai	„	62— 98	80
Şobolan	„	—	241

Martino [40] este unul dintre primii cercetători care a analizat conţinutul în fosfagen al muşchilor striaţi. El a constatat că, la iepure, muşchii care se contractă rapid conţin 25 — 28 mg% fosfagen, pe cînd cei care se contractă lent conţin abea 10,5—14,5 mg% fosfagen. Pentru muşchii de porumbel autorul găseşte un tablou asemănător, şi anume că muşchii activi conţin 23,5—27 mg% fosfagen, pe cînd cei inactivi conţin 10—12 mg% fosfagen. Din analiza acestor date, Martino [41] ajunge la concluzia că muşchii capabili de o contracţie rapidă conţin o cantitate mai mare de fosfagen decît muşchii care prezintă o contracţie lentă. Această concluzie este întărită de constatarea că şi muşchii speciilor de peşti activi conţin 0,20- 0,58 mg% fosfagen, faţă de muşchii speciilor de peşti mai puţin activi, care au un conţinut de 0,09—0,22 mg% fosfagen [42].

În aceeași perioadă apare lucrarea lui Eggleton și Eggleton [43] prin care se arată prezența fosfogenului în toate tipurile de mușchi ai vertebratelor, dar inexistența lui în mușchii nevertebratelor. De asemenea, se stabilește că în mușchii striați de broască nivelul fosfagenului este mai ridicat decît acela al mușchilor netezi ai stomacului de broască.

Tabela nr. 2

Cantitățile de fosfagen din diferiți mușchi (39) în μ moli/g țesut umed

Familia	Gen	Mușchi	Tip	Fosfagen
Sipunculoidea	*Phacolosoma*	De susținere	Neted	3—22
	Sipunculus	De susținere	„	55
Mollusca	*Helix*	Pharynx retractor	Neted	—
	Mytilus	Pedal retractor	„	10
Annelida	*Lumbricus*	De susținere	Neted	6,1
Echinodermata	*Thyone*	De susținere	Neted	5,7
Chordata	Iepure	Scheletic	Striat	32
	Iepure	Cardiac	Striat	3
	Iepure	Uter	Neted	1,3
	Broască	Scheletic	Striat	9—18

Din aceste cîteva cercetări se infiripă ideea participării fosfagenului în procesul contracției musculare, presupunîndu-se atît legătura între cantitatea de fosfagen prezentă în mușchi și comportarea fiziologică a mușchiului, cît și existența unor relații între cantitatea de fosfagen din mușchi și excitabilitatea musculară. Aceasta cu atît mai mult cu cît Martino [44], cercetînd prezența fosfagenului și în alte organe ca: creierul, rinichii, ficatul, splina, plămînii, tiroida, capsulele suprarenale, pancreasul, ovarele și glandele salivare, nu reușește să-l identifice cu metodele existente atunci. Concluzia lui este că fosfagenul se găsește numai în mușchii striați și în extractul acestor mușchi [45].

Pornind de la aceste constatări, Martino și Zanghi [46] analizează distribuția fosfagenului în diferite părți ale fibrei musculare și în inimă [47]. În acest scop s-a folosit mușchiul sartorius de cîine și de pisică, mușchiul pectoral de porumbel și, uneori, cel abdominal. Fibrele musculare au fost tăiate în trei părți și s-au supus analizei atît mijlocul fibrei, cît și capetele fiecăreia dintre cele trei părți ale fibrei. S-a constatat că porțiunile de la mijlocul fibrei conțin cea mai mare cantitate de fosfagen. De aici și concluzia că fosfagenul se găsește într-o mai mare măsură în acea parte a fibrei care este mai apropiată de plexul motor. Este interesantă de semnalat, în această ordine de idei, lucrarea lui Hill [48], care în 1962 reia astfel de cercetări și constată că fosfagenul este concentrat în benzile înguste care se găsesc de fiecare parte a liniilor Z. Cam 2/3 din cantitatea totală de fosfagen prezentă în mușchi este concentrată în această porțiune a fibrei, iar restul este distribuit uniform în banda A.

La cele spuse mai sus se mai poate adăuga că în 1953, folosind metode moderne de dozare și separare a esterilor fosforici din mușchi, Caldwell [49] a confirmat prin datele sale concluziile cercetărilor ce le-am expus mai sus. El constată că mușchiul de broască obișnuită conține mai mult fosfagen și ortofosfat decît mușchiul de broască țestoasă, care, din punct de vedere fiziologic, este de zece ori mai lent decît cel de broască obișnuită. Tonzetich [50],

studiind ATP-aza din mușchii striați, ajunge și el la concluzia că mușchiul striat conține mai mult fosfagen decît mușchiul neted.

O dată cu descoperirea de către Meyerhof și Lohmann [4] a unui alt compus — arginin-fosfatul — în mușchii nevertebratelor, cercetările s-au orientat spre studiul comparativ al repartiției fosfocreatinei și fsofoargininei în mușchii vertebratelor și nevertebratelor. Rezultatele obținute au dus la formularea ipotezei, emise de Meyerhof [51], că toate vertebratele conțin în mușchii lor striați fosfagen (creatinfosfat), pe cînd nevertebratele conțin argininfosfatul.

Sintetizînd datele obținute în această direcție și efectuînd cercetări proprii, Palladin [52] arată că mușchii care diferă prin funcțiunile lor au și un conținut diferit de fosfagen. Determinările făcute pe mușchi de iepure, cobai și cocoș au demonstrat că mușchii care se contractă rapid (mușchi albi, ca *m. biceps femoris*, capabili să se excite și să se contracte prompt) sînt mai bogați în fosfagen decît mușchii roșii (de exemplu *m. semitendinosus* de iepure), care se contractă mai lent și sînt mai săraci în fosfagen. Mușchiul aductor de iepure, care ocupă o poziție intermediară între mușchii albi și cei roșii, are și un conținut mijlociu de fosfagen. De altfel, în 1963, un grup de cercetători au comunicat că nivelul fosfagenului este mai ridicat în fibrele musculare provenite din mușchi albi [53].

În 1935, Eggleton [54] determină conținutul în fosfagen al mușchilor netezi și remarcă faptul că fosfagenul se comportă în acești mușchi la fel ca și în mușchii scheletici sau în mușchiul cardiac.

Cam în această perioadă, stabilindu-se că fosfagenul este un compus caracteristic mai ales mușchiului striat, cercetările s-au îndrumat spre lămurirea rolului pe care acest compus îl joacă în procesele biochimice din cursul contracției musculare.

Ansamblul cercetărilor fizico-chimice și biochimice care s-au efectuat a dus la concluzia că această substanță ocupă un loc deosebit în desfășurarea proceselor care au loc în cursul contracției musculare. La formularea acestei concluzii și-au adus aportul o serie de cercetători renumiți ca Lundsgaard [55], Meyerhof [51], Embden [56] și alții.

Primele observații comunicate de Lundsgaard au arătat că intoxicarea mușchiului cu acid monoiodacetic duce la oprirea formării post mortem a acidului lactic, fără să se afecteze în acest fel proprietatea mușchiului de a se contracta. După cîteva contracții, fosfagenul se hidrolizează complet, ceea ce duce la intrarea mușchiului în contractură. S-a emis, în consecință, părerea că fosfagenul este furnizorul energiei necesare contracției.

Embden a prezentat însă o seamă de dovezi experimentale pentru a demonstra că formarea acidului lactic nu este în legătură cu sursa de energie folosită în contracție, deoarece în momentul contracției mușchiul devine alcalin. După părerea lui, o condiție necesară contracției musculare este formarea amoniacului, părere care a fost mai tîrziu contrazisă ca fiind nefondată. În prezent se știe că amoniacul format în cursul contracției musculare își are originea în procesul de dezaminare a acizilor adenilici. Hidroliza crescută a fosfagenului, ca și a acizilor adenilici, a fost de altfel comunicată de Cahn și Houget [57], [58].

Pe mușchi de șobolan stimulat, Sacks și Sacks [59], [60] au observat că hidroliza fosfagenului este proporțională cu cantitatea de acid lactic formată; rolul fosfagenului ar fi deci de a tampona acidul lactic format și, în felul acesta, de a păstra în cursul contracției un pH constant.

Analizînd raporturile dintre procesele chimice și cele fizice care au loc în cursul contracției musculare, Meyerhof [61] a ajuns la concluzia că schimbările de volum care se constată în cursul acestui proces se datoresc variațiilor de volum molecular ale substanțelor care se descompun. Conform acestei ipoteze, diminuarea de volum care are loc în tetanosul mușchiului se datorește scindării fosfagenului, iar revenirea la starea normală se datorește dilatării produse de formarea acidului lactic.

Schema posibilă a proceselor biochimice care au loc în cursul contracției a fost dată în 1935 de către Parnas și Ostern [62].

Unele fapte interesante au fost observate în timpul studiilor asupra variațiilor impedanței în mușchi [63]. Cînd mușchiul se află în condiții strict izometrice, contracția lui este însoțită de două măriri ale impedanței (undele $+b_1$ și $+b_2$). Unda $+b_1$ își atinge maximul în timpul contracției, unda $+b_2$ — în timpul decontracției. Aceste fenomene l-au făcut pe autor să le pună în raport cu procesele chimice. În mediu anaerob, unda $+b_2$ se reconstituie cu greu, oricare ar fi pauza dintre cele două excitații, în timp ce unda $+b_1$ nu pare să sufere modificări. Cînd mușchiul este intoxicat cu acid monoiodacetic, unda $+b_2$ nu se realizează deloc, în timp ce unda $+b_1$ rămîne neschimbată. Aceste fapte arată că unda $+b_2$ este în raport cu procesele de scindare și de resinteză a fosfagenului, fiind o manifestare fizică a chimismului fosfagenului.

Pînă în 1936 se afirma că fosfagenul este primul donator de energie în procesele care stau la baza fenomenului de contracție musculară. O serie de cercetări ulterioare au dus însă la formularea unei alte idei, și anume că fosfagenul este numai o sursă energetică de rezervă pentru substanțele care reacționează cu o mare viteză, cum este de pildă ATP-ul. Cu toate acestea, Mujeev și colab. [64] își pun problema dacă scindarea fosfagenului trebuie privită ca o sursă directă, necesară pentru păstrarea sau revenirea la starea normală a mușchiului, sau dacă fosfagenul este pur și simplu o verigă în lanțul proceselor metabolice din mușchi, în centrul căruia se află o moleculă proteică activă sau o structură mult mai complexă, în stare specială de dezechilibru.

În 1947, concepțiile existente cu privire la procesele biochimice din mușchi în timpul contracției musculare erau, după Dubuisson [65], următoarele :

1. Partea contractilă a mușchiului trebuie să fie constituită din mai multe proteine. Fosfagenul este, foarte probabil, prins în acest edificiu care constă dintr-un anion complex, nedifuzibil, a cărui încărcare reține electrostatic cea mai mare parte a K^+ existent în anion.

2. Primele momente ale contracției sînt însoțite de o reacție puternic exotermică, iar decontracția este însoțită de o reacție contrară, izotermică. Este deci dificil să se admită că scurtarea este rezultatul unei diminuări a energiei potențiale a edificiului contractil, care va fi restituită în decontracție printr-un proces exotermic. Această eliberare bruscă de energie inițială se face concomitent cu creșterea concentrației ionilor de H. Deci, generatorul inițial de energie trebuie să fie hidroliza ATP-ului.

3. Decontracția unui mușchi nu poate fi considerată ca rezultatul unei simple reîntoarceri pasive la o poziție de echilibru a edificiului contractil, ca urmare a încetării acțiunii stimulului. Decontracția este mult prea rapidă pentru petrecerea unui astfel de fenomen. Ea este cuplată cu hidroliza fosfagenului. În cazul unui deficit de fosfagen (intoxicare cu acid monoiodacetic), decontracția poate să nu mai aibă loc.

4. Există o serie de dovezi prin care se constată relațiile strînse care există între proteinele edificiului contractil, ATP și ATP-ază.

Toate aceste considerații au dus la admiterea, oarecum definitivă, a ideii că scindarea ATP-ului trebuie să ocupe primul loc în ceea ce privește ordinea donatorilor de energie [67—68]. Funcția fosfagenului este aceea de rezervă de grupări fosfatice macroergice. Mușchiul conține cantități relativ mici de ATP, care s-ar consuma destul de repede dacă ADP-ul format prin descompunerea lui nu ar fi rapid refosforilat, în dauna fosfagenului, prin reacția Lohmann.

În concluzie, energia liberă a legăturilor macroergice ale fosfagenului nu este disponibilă imediat pentru mușchi, dar poate fi făcută disponibilă prin transferul lor la ADP prin reacția Lohmann. Această concluzie este întărită și de studiul repartiției fosforului în mușchiul striat, pe care îl reproducem după Baldwin [66].

Cercetările făcute după 1950, cu metode mai precise, au dus la obținerea unor date noi, care se contrazic chiar între ele. Problema s-a pus în felul următor: dacă energia necesară lucrului mecanic depus de mușchi provine din hidroliza ATP-ului, cu formare de ADP și ortofosfat, ar urma ca în mușchii stimulați să apară produșii de scindare ai ATP-ului. Caldwell [49], făcînd astfel de determinări pe mușchii stimulați și nestimulați, a găsit însă că în

Tabela nr. 3

Repartiția fosforului în mușchiul striat (mg P/100 g)

Felul animalului	P anorganic	P fosfagenic	P piro-fosforic	Rația $\frac{\text{P (anorg. + pirofosf.)}}{\text{P pirofosfat disponibil}}$
Broască	30	50	30	5,3
Șobolan	35	80	40	5,7
Iepure	26	62	40	4,4

mușchii stimulați se constată doar descreșterea fosfagenului și creșterea fosforului anorganic. Pe mușchi intoxicați cu acid monoiodacetic, autorul a confirmat concluziile lui Lundsgaard din 1930, după care cantitatea de ATP descrește, iar cea de ADP crește. Concluzia lui Caldwell este că în timpul obosirii mușchiului nu are loc o scindare hidrolitică a ATP-ului, deoarece întreg fosforul, care dispare din ATP și din fosfagen, reapare în fracțiunea difosforică, și nu ca ortofosfat. La mușchiul lent de broască țestoasă, după cinci minute de stimulare ATP-ul nu se schimbă, pe cînd ortofosfatul are tendință de creștere, iar fosfagenul scade; acest fapt ar fi în favoarea ipotezei după care fosfagenul ar fi principalul donator de energie.

Uchida și colab. [69], au determinat ATP-ul și ADP-ul din mușchiul drept abdominal, m. semitendinosus și m. gastrocnemian în contracție tetanică. Făcînd în paralel și determinări de fosfagen au ajuns la concluzia că fosfagenul este scindat în faza inițială de contracție și că ATP-ul este sursa imediat accesibilă de energie pentru contracție. Din acest moment începe șirul lucrărilor experimentale care își pun drept scop găsirea dovezilor pentru demonstrarea scindării ATP-ului în primele momente ale contracției.

Folosind metode noi și moderne, cum este metoda cromatografiei pe hîrtie și determinări în ultraviolet, Fleckenstein și colab. [70] au recurs la mușchi care reacționează lent (de la broaște țestoase), la mușchi subțiri (drept abdominal), la mușchi care au fost răciți în prealabil înainte de înghețare și la mușchi înghețați imediat după excitare, la care s-a determinat ATP-ul. Nu s-a observat vreo scindare a ATP-ului, ceea ce, după părerea autorilor, arată că nu sînt relații directe între ATP și fosfagen. Se constată doar scindarea de fosfagen, dar și aceasta are loc numai în tetanos, în timpul primei secunde. La 0 °C nu se scindează nici fosfagenul.

În experiențele pe care le-a făcut pe mușchi drept abdominal de broască, în stare de repaus sau de contracție, Lange [71] a constatat că ATP-ul scade doar la aproximativ 1/8 din conținutul său, corespunzător cu creșterea ADP-ului.

Cu toate acestea, Fleckenstein [72], [73] susține că lucrul mecanic efectuat de mușchi nu poate fi evaluat prin variațiile ATP-ului sau fosfagenului, ceea ce exclude existența unei simple relații între contracție și scindarea sau resinteza ATP-ului.

Dezbaterea problemei primului donator de energie în contracția musculară a dus la apariția unor lucrări deosebit de interesante, începînd cu cele ale lui Mommaerts, care a încercat să stabilească ordinea și amplitudinea variațiilor chimice în timpul diferitelor faze

ale ciclului de contracţie şi relaxare, pînă la lucrările lui Davies, care a formulat nu de mult o nouă ipoteză a contracţiei la nivel molecular.

Astfel, Mommaerts [74], folosind la dozarea ATP-ului, ADP-ului, AMP-ului, creatinei, creatininei şi fosfagenului micrometode enzimatico-spectrofotometrice, a ajuns la concluzia că în cazul secuzei unice a muşchiului nu are loc vreo scindare a ATP-ului sau a fosfagenului.

După Needham [75], se pare că din rezultatele unor astfel de cercetări se pot trage două concluzii :

1) ATP-ul, fiind descompus, este imediat refosforilat cu ajutorul unei substanţe necunoscute ; sau

2) un alt compus decît ATP-ul poate, în anumite condiţii, să furnizeze direct miofibrilelor energie liberă, prin descompunerea sa.

Jendrassik şi Faiszt [76], pentru a elimina contracţia care se produce la îngheţarea muşchiului în aer lichid, au folosit pentru fixarea compuşilor macroergici o soluţie puternic alcalină de hidroxid de sodiu, iar pentru a înlătura efectul excitant al terminaţiilor nervoase, au lucrat pe animale curarizate. Ei au constatat că excitarea electrică directă, folosită la producerea unui tetanos izometric, duce la scindarea ATP-ului şi a fosfagenului, în timp ce contracţia în gol (*Leerkontraktion*) nu duce la nici o schimbare în conţinutul compuşilor macroergici.

După Dixon şi Sacks [77], care au lucrat cu fosfor radioactiv în condiţii anaerobe, un tetanos de 30 secunde al gastrocnemianului de pisică nu produce nici o variaţie în concentraţia ATP-ului sau a ADP-ului. Datele obţinute cu ajutorul trasorilor radioactivi arată că nu există vreo redistribuire a fosforului între fosforul terminal al ATP-ului şi cel al fosfagenului, aşa cum ar fi fost de aşteptat dacă ar avea loc resinteza ATP-ului prin transferul grupării fosforice de la fosfagen. Nu s-a putut dovedi vreun echilibru al izotopului între P terminal şi mijlociu al ATP-ului şi P terminal al ADP-ului, aşa cum ar fi fost de aşteptat dacă miokinaza ar lua parte la sinteza ADP-ului. Concluzia acestei lucrări este că energia necesară contracţiei este procurată pe alte căi decît prin acelea de defosforilare a ATP-ului.

Totuşi, din calculul constantei de echilibru pentru reacţia Lohmann de transfer se pare că fosfagenul joacă rolul de rezervă de grupări fosforice [78]. În ecuaţia :

$$CP + ADP \rightleftharpoons Cr + ATP$$

nu iau parte nici apa, nici fosfatul anorganic. Constanta de echilibru exprimată în forma logaritmică rP a sistemului creatină—creatinfosfat şi ADP—ATP prezintă un interes deosebit, deoarece diferenţa valorii r'P pentru acest sistem determină direcţia reacţiei de transport. Constantei de echilibru îi corespunde o concentraţie mare de ATP şi o concentraţie mică de fosfagen.

Unii autori susţin că factorul fundamental care determină scindarea substanţelor macroergice este tensiunea activă, iar după aceea travaliul [79]. Substanţele care produc contractura duc şi la scindarea substanţelor macroergice. Uneori, chiar atunci cînd efectul fizic lipseşte, deci cînd contracţia nu este vizibilă, ca în cazul acţiunii ionilor de potasiu, se observă scindarea acestor substanţe.

Cain şi colab. [80], folosind metode de extracţie mai blînde şi metode analitice mai precise, au cercetat posibilitatea scindării fosfagenului în timpul contracţiei unice. Experienţele au arătat că în acest caz se eliberează creatină şi fosfor anorganic. De asemenea, în muşchiul care trebuie să depună anumite eforturi se descompun diferite cantităţi de fosfagen, cu eliberare de fosfor anorganic şi creatină. Există o relaţie liniară între cantitatea de travaliu şi gradul de scindare a fosfagenului. Autorii consideră că s-ar putea lămuri o serie de aspecte

în problema primului donator de energie, dacă enzima creatinfosforiltransferaza ar putea fi inhibată.

Pornind de la constatările unor autori, că *1*-fluor-*2,4*-dinitrobenzenul (FDNB) inhibă creatinfosforiltransferaza, Cain şi colab. [81] [82] au aplicat această substanţă inhibitoare în situ. După cum reiese din valorile publicate, după tratamentul cu DNP şi FDNB, contracţia muşchiului este însoţită de creşterea fosforului anorganic, cu toate că fosfagenul rămîne neschimbat. Autorii ajung la concluzia că energia necesară contracţiei este eliberată din scindarea ATP-ului. În muşchiul care lucrează normal, creatinfosforiltransferaza face disponibilă energia depozitată în fosfagen. Pentru muşchiul drept abdominal de broască în travaliu, ATP-ul este folosit pentru contracţiile unice, fiind apoi rapid reconstituit prin acţiunea creatinfosforiltransferazei şi a miokinazei.

Deoarece diferiţi muşchi luaţi în cercetare dau rezultate diferite, Mommaerts [83] a reluat astfel de experienţe. După acest autor, muşchiul sartorius de broască, folosit la determinarea modificărilor chimice care au loc în contracţiile musculare izotonice, nu furnizează date prin care să se poată stabili o corelaţie între metabolismul crescut şi scurtarea muşchiului.

Mai tîrziu, acelaşi autor [84] a căutat să demonstreze că într-un tetanos scurt al aceluiaşi muşchi se descompune fosfagenul, fără să se observe vreo micşorare sesizabilă a ATP-ului faţă sau vreo formare de ADP. Deci, demonstrarea directă a priorităţii descompunerii ATP-ului faţă de descompunerea fosfagenului a rămas încă actuală. Autorul a constatat că muşchiul de broască ţestoasă se poate contracta fără să se observe o scindare a fosfagenului [85]. Dimpotrivă, în muşchiul rectus femoris şi în sartorius se poate observa scindarea fosfagenului.

Studiind hidroliza fosfagenului în timpul unui travaliu izotonic, Mommaerts şi colab. [86] o apreciază după ecuaţia :

$$R = A_{t_1} + ax\,W$$

în care A_{t_1} este căldura de menţinere în funcţie de durata tetanosului şi de lungimea muşchiului ; ax este căldura asociată scurtării x şi W este travaliul executat. Dacă ecuaţia de mai sus are un echivalent chimic, fosfagenul hidrolizat (PC) va trebui să fie funcţie de travaliul executat şi de scurtare, iar ecuaţia să capete o altă formă. Rezultatele determinărilor au confirmat ipoteza. Entropia sistemului format din fosfagen şi matricea proteică contractilă nu se schimbă în timpul contracţiei.

Foarte recent, Infante şi colab. [87] au arătat că în timpul contracţiilor unice este folosit ATP-ul care se resintetizează cu participarea ATP-creatintransfosforilazei şi ATP—AMP-transfosforilazei (miokinazei). Scindarea fosfagenului la 0 °C în timpul contracţiilor unice izotonice a fost observată pe muşchiul drept abdominal de broască, tratat cu DNP ; s-a constatat că există o relaţie lineară între cantitatea de fosfagen scindată şi lucrul depus.

Din aceste experienţe autorii ajung la concluzia că scindarea ATP-ului şi fosfagenului ar avea loc în cazul cînd tensiunea dezvoltată duce la efectuarea unor mişcări relativ intime ale filamentelor de actină şi de miozină, ca în cazul contracţiei izotonice. Această scindare nu ar trebui să aibă loc în cazul contracţiei izometrice la muşchii supratensionaţi sau supracontractaţi. Şi totuşi, relativ marea scindare a fosfagenului care are loc în cursul contracţiei izometrice, cînd lungimea muşchiului este apropiată de aceea a muşchiului în repaus, este probabil manifestarea unui travaliu intern continuu ; probabil, în interiorul muşchiului are loc o mişcare ultra-micro a acestor filamente, care duce la exprimarea lucrului sub formă de căldură de fricţiune.

Această concluzie, ca şi considerarea ATP-ului ca sursă principală de energie în contracţia musculară [88], se pare că se verifică în cadrul ipotezei emise de Davies în 1963, privitoare la mecanismul contracţiei musculare la nivel molecular.

Din această foarte succintă expunere se poate observa că apariția noilor metode de cercetare a complicat problema lămuririi rolului fosfagenului în procesele biochimice care stau la baza fenomenelor de contracție musculară. Faptul că însuși materialul pe care se lucrează, ca și modul de lucru, este diferit, de la autor la autor, a făcut ca rezultatele să fie destul de heterogene și, din această cauză, destul de greu de comparat între ele. La cele semnalate mai sus se mai adaugă faptul că în general nu a existat o linie directoare în conducerea cercetărilor. Probabil, că prin apariția unei ipoteze de lucru care pare să fie destul de plauzibilă, mulți cercetători își vor concentra eforturile într-o unică direcție, ceea ce, desigur, va contribui la elucidarea unei probleme atît de importante pentru fiziologie, cum este aceea a mecanismului contracției musculare și, implicit, aceea a rolului pe care fosfagenul îl joacă în desfășurarea acestui proces.

Prezentată la redacție
la 17 iulie 1965

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. Eggleton P., G. P. Eggleton, Biochem. J., **21**, 190 (1927).
2. Fiske C. H., Y. Subbarow, J. Biol. Chem., **74**, XXII (1927).
3. Fiske C. H., Y. Subbarow, J. Biol. Chem., **81**, 629 (1929).
4. Meyerhof O., K. Lohmann, Biochem. Z., **196**, 22 (1928).
5. Arnold A., J. M. Luck, J. Biol. Chem., **99**, 677 (1933).
6. Kurtz A. C., J. M. Luck, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., **37**, 299 (1937).
7. Thoai N. V., J. Roche, Y. Robin, N. V. Thiem, Biochim. Biophys. Acta, **11**, 593 (1953).
8. Thoai N. V., J. Roche, Y. Robin, N. V. Thiem, Compt. Rend. Soc. Biol., **147**, 1 241 (1953).
9. Thoai N. V., J. Roche, Y. Robin, N. V. Thiem, Compt. Rend. Soc. Biol., **147**, 1 670 (1953).
10. Thoai N. V., Y. Robin, Biochim. Biophys. Acta, **14**, 76 (1954).
11. Lissitzky S., I. Garcia, J. Roche, Compt. Rend. Soc. Biol., **148**, 436 (1954).
12. Roche J., R. Baret, Y. Robin, Compt. Rend. Soc. Biol., **148**, 443 (1954).
13. Garcia I., J. Roche, M. Tixier, Bull. Soc. Chim. Biol., **38**, 1 423 (1956).
14. Roche J., M. Mourgue, R. Dokhan, Bull. Soc. Chim. Biol., **37**, 55 (1955).
15. Hobson G. E., K. R. Rees, Biochem. J., **61**, 549 (1955).
16. Roche J., N. V. Thoai, J. L. Hatt, T. Thi An, Compt. Rend. Soc. Biol., **150**, 112 (1956).
17. Garcia I., M. Tixier, J. Roche, Compt. Rend. Soc. Biol., **150**, 321 (1956).
18. Roche J., Y. Robin, F. di Jeso, N. V. Thoai, Compt. Rend. Soc. Biol., **150**, 830 (1956).
19. Roche J., N. V. Thoai, J. L. Hatt, Compt. Rend. Soc. Biol., **150**, 1 686 (1956).
20. Roche J., N. V. Thoai, Y. Robin, L. A. Pradel, Compt. Rend. Soc. Biol., **150**, 1 684 (1956).
21. Thoai N. V., J. Roche, Biohimiia, **22**, 319 (1957).
22. Roche J., N. V. Thoai, Y. Robin, Biochim. Biophys. Acta, **24**, 519 (1957).
23. Robin Y., N. V. Thoai, L. A. Pradel, J. Roche, Compt. Rend. Soc. Biol., **150**, 1 892 (1956).
24. Roche J., Y. Robin, Compt. Rend. Soc. Biol., **148**, 1 541 (1954).
25. Thoai N. V., Compt. Rend. Soc. Biol., **150**, 1 889 (1956).
26. Robin Y., N. V. Thoai, J. Roche, Compt. Rend. Soc. Biol., **151**, 2 015 (1957).
27. Robin Y., L. A. Pradel, N. V. Thoai, J. Roche, Compt. Rend. Soc. Biol., **153**, 21 (1959).
28. Robin Y., L. A. Pradel, N. V. Thoai, J. Roche, Compt. Rend. Soc. Biol., **153**, 54 (1959).

29. KALKAR H. M., Chem. Rev., **38**, 71, (1941).
30. ENNOR A. H., J. F. MORRISON, Physiol. Rev., **38**, 631 (1958).
31. ENNOR A. H., H. ROSENBERG, Biochem. J., **51**, 606 (1952).
32. DRABIKOWSKI W., Acta biochimica polonica, **III**, 119 (1956).
33. DRABIKOWSKI W., Postepy Biochemii **IX**, 233 (1963).
34. ALEKSEEVA A. M., N. M. TIMOFEEVA, Biohimiia, **22**, 976 (1957).
35. SUZUKI HISAO, Chem. Abstr., **51**, 13 149 d (1957).
36. BISTOCCHI M., Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., **33**, 1 786 (1957/58).
37. GERLACH E., JANKE J., Biochem. Ztschr., **330**, 565 (1958).
38. DANG BA PHO, Teză de doctorat, Paris, 1960.
39. HANSON J., J. LOWY, *Contractile apparatus in invertebrate animals.* din *The structure and function of muscle*, sub redacția lui G. Bourne, I, p. 300, Academic Press, N. Y., 1960.
40. MARTINO G., Chem. Abstr., **22**, 2 595 (1928).
41. MARTINO G., Chem. Abstr., **24**, 1 666[7] (1930).
42. ZAGAMI V., Chem. Abstr., **24**, 2 781[4] (1930).
43. EGGLETON P., G. P. EGGLETON, J. Physiol., **65**, 15 (1928).
44. MARTINO G., Chem. Abstr., **23**, 406 (1929).
45. MARTINO G., Chem. Abstr., **23**, 2 471 (1929).
46. MARTINO G., ZANGHI G., Chem. Abstr., **23**, 854 (1929).
47. MARTINO G., ZANGHI G., Chem. Abstr., **23**, 5 497 (1929).
48. HILL D. K., Journ. Physiol., **164**, 31 (1962).
49. CALDWELL P. C., Biochem. J., **55**, 459 (1953).
50. TONZETICH J., Chem. Abstr., **47**, 12 597 i (1953).
51. MEYERHOF O., Lancet, **II**, 1 415 (1930).
52. PALLADIN A., Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 13 (1931).
53. BEATY C. H., R. D. PETERSON, R. M. BOCEK, Amer. J. Physiol., **204**, 939 (1963).
54. EGGLETON M. G., J. Physiol., **82**, 79 (1934).
55. LUNDSGAARD E., Biochem. Ztschr., **227**, 51 (1930).
56. EMBDEN G., Chem. Abstr., **24**, 5 352[7] (1930).
57. CAHN T., HOUGET J., Compt. Rend. Soc. Biol., 109, 1 355 (1932).
58. CAHN T., J. HOUGET, Chem. Abstr., **27**, 8 386[9] (1933).
59. SACKS J., W. C. SACKS, Amer. J. Physiol., **108**, 521 (1934).
60. SACKS J., W. C. SACKS, Amer. J. Physiol., **105**, 687 (1933).
61. MEYERHOF O., Ann. Inst. Pasteur, **53**, 565 (1934).
62. PARNAS J. K., P. OSTERN, Biochem. Ztschr., **279**, 94 (1935).
63. DUBUISSON M., Compt. Rend. Soc. Biol., **122**, 817 (1936).
64. MUJEEV V. A., T. A. SVIDERSKAYA, Z. I. SHITOVA, Arch. Sci. biol. U.R.S.S., **44**, 3, 77 (1936).
65. DUBUISSON M., Experientia, **3**, 213 (1947).
66. BALDWIN E., Dynamic aspects of biochemistry, Cambridge, 1953, p. 400.
67. POLONOVSKI M., Biochimie médicale, Masson, Paris, 1952, p. 402.
68. SORU E., Biochimie medicală, Edit. Stat, București, 1953, p. 525.
69. KOKI UCHIDA, ITSURO MAHARA, TAKESHI ISHIZUKA, HIROSHI SATO, Chem. Abstr., **51**, 2 916 f (1957).
70. FLECKENSTEIN A., J. JANKE, G. LECHNER, G. BAUER, Pflügers Archiv, **259**, 246 (1954).
71. LANGE G., Experientia, **10**, 268 (1954).
72. FLECKENSTEIN A., J. JANKE, R. E. DAVIES, H. A. KREBS, Nature, **174**, 1 081 (1954).
73. FLECKENSTEIN A., J. JANKE, R. E. DAVIES, 3° *Congres Intern. Biochimie*, Brussels, 79 (1955).
74. MOMMAERTS W. F. H. M., Amer. J. Physiol., **182**, 585 (1955).
75. NEEDHAM D. M., Brit. Med. Bull., **12**, 194 (1956).
76. JENDRASSIK L., J. FAISZT, Ann. Univ. Sci. Budapest. de Rolando Eötvös Nom. Sect. Biol., **I**, 133 (1957).
77. DIXON G. J., J. SACKS, Amer. J. Physiol., **193**, 129 (1958).
78. BRAY J., K. WHITE, *Kinetika i termodinamika biohimiceskih proțessov*, Izd. Innostr. Lit., Moskva, 1959, p. 148.
79. JENDRASSIK L., J. FAISZT, Trudi V Mejdunarod. Bioh. kongressa, Moskva, 1962, p. **430**.
80. CAIN D. F., A. A. INFANTE, R. E. DAVIES, Nature, **196**, 214 (1962).

81. Cain D. F., R. E. Davies, Biochem. Biophys. Res. Comm., 8/5, 361 (1962).
82. Infante A. A., R. E. Davies, Biochem. Biophys. Res. Comm., 9/5, 410 (1962).
83. Mommaerts W. F. H. M., K. Seraydarian, G. Maréchal, Biochim. Biophys. Acta, **57**, 1 (1962).
84. Mommaerts W. F. H. M., K. Seraydarian, A. Wallner, Biochim. Biophys. Acta, **63**, 75 (1962).
85. Mommaerts W. F. H. M., M. Olmsted, K. Seraydarian, A. Wallner, Biochim. Biophys. Acta, **63**, 82 (1962).
86. Mommaerts W. F. H. M., K. Seraydarian, G. Maréchal, Arch. intern. physiol. bioch., **LXX**, 127 (1962).
87. Infante A. A., D. Klaupiks, R. E. Davies, Nature, **201**, 620 (1964).
88. Davies R. E., *Sixth Intern. Congr. Biochem., New York 1964*, Academic Press, Abstracts, VII, p. 640.
89. Davies R. E., Nature, **199**, 1 068 (1963).

Fermenti, editată de A. E. Braunstein, Izd. Nauka, Moscova, 1964, 312 pag.

Volumul reprezintă una dintre primele monografii scoase de Consiliul pentru problemele biologiei musculare al Academiei de Ştiinţe a U.R.S.S., în seria „Bazele biologiei musculare", sub redacţia acad. V. A. Engelhardt.

Volumul este alcătuit din 10 capitole, fiecare dintre acestea fiind scris de diferiţi specialişti şi prezentînd principalele idei, metode şi perspective în cercetările actuale de enzimologie.

Capitolul I, scris de A. E. Braunstein, reprezintă o *introducere* şi cuprinde un succint istoric al principalelor progrese în enzimologie din ultimele decenii şi unele aspecte critice privind clasificarea unică şi nomenclatura enzimelor, adoptată în 1961 de Comisia pentru enzime a Uniunii internaţionale de biochimie.

Capitolul al II-lea, scris de E. V. Goriancenkova, prezintă în mod succint *principalele principii ale separării preparative şi ale purificării enzimelor*, cum sînt : metodele spectrofotometrice, colorimetrice, manometrice pentru determinarea cantitativă a enzimelor ; metodele de solubilitate şi fracţionare, adsorbţie selectivă, cromatografia, electroforeza, cristalizarea.

În capitolul al III-lea, V. A. Iakovlev tratează pe larg *cinetica enzimatică* : despre noţiunile de bază ale cineticii fermentative, mecanismul reacţiilor enzimatice şi legătura lor cu cinetica, despre cinetica inhibării reacţiilor enzimatice. Importanţă deosebită prezintă aspectele legate de influenţa concentraţiei ionilor de hidrogen şi a temperaturii asupra vitezei reacţiilor enzimatice.

Capitolul al IV-lea, scris de O. L. Polianovski, descrie *rolul grupărilor funcţionale proteice ale enzimelor*. Sînt date caracteristicile individuale ale însuşirilor şi funcţiilor cîtorva din grupele conţinute de enzime, cum sînt : gruparea imidazolică a histidinei, gruparea hidroxilică a serinei, gruparea ε-aminică a lizinei şi grupările carboxilice. Sînt enunţate metodele curente pentru evidenţierea şi identificarea grupărilor funcţionale în centrii activi ai enzimelor.

Despre *grupările sulfhidrilice şi disulfhidrilice în enzime* se ocupă I. M. Torcinski în capitolul al V-lea, unde se prezintă însuşirile chimice ale grupărilor —SH, diferite tipuri de grupări SH proteice, cauzele reactivităţii scăzute a grupărilor SH legate de proteine, despre funcţiunile acestor grupări şi rolul lor în formarea compuşilor intermediari în cursul catalizei, în legarea substratelor şi a confactorilor şi în menţinerea configuraţiei catalitice active a enzimelor.

Capitolul al VI-lea scris de A. M. Iurkevici, E. S. Severin şi A. E. Braunstein, cuprinde *cofactorii organici ai enzimelor-coenzimele*. Este dată clasificarea tipurilor de transformări catalizate de diferite coenzime. În mod detaliat sînt descrise coenzimele care transferă hidrogen şi electroni, coenzimele care participă la sinteza, izomerizarea şi descompunerea legăturilor C—C.

V. Z. Gorkia expune pe scurt în capitolul al VII-lea *rolul metalelor în acţiunile catalitice ale enzimelor* şi arată că, din cele peste 660 de enzime cunoscute, 180 sînt metal-enzime. Este dată schema clasificării metal-enzimelor după Bray şi Harrap (1959). Sînt prezentate, în continuare, principalele metode de studiere a metal-enzimelor şi concepţiile actuale despre participarea metalelor în cataliza enzimatică.

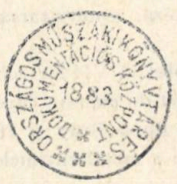
În capitolul următor, L. A. Blumenfeld și A. P. Purmal se ocupă despre „*Fero-porfirine*". Se descriu însușirile chimice și fizico-chimice ale fero-porfirinelor, însușirile lor catalitice. Din grupa enzimelor fero-porfirinice se dă atenție mai mare citocromilor și enzimelor catalază și peroxidază, care, deși sînt foarte amănunțit studiate, datorită puternicei lor activități catalitice, nu sînt încă complet lămurite funcțiunile lor biologice.

Capitolul al IX-lea, scris de A. E. Braunstein, V. I. Karpeiski și E. M. Pomatov, cuprinde *concepțiile actuale despre mecanismul acțiunii catalitice a enzimelor.* Sînt descrise însușirile complecșilor dintre enzime și substraturi, natura centrilor activi ai enzimelor și rolul interacțiunii grupărilor funcționale în cataliza enzimatică. Autorii arată că în centrii activi ai enzimelor sînt concentrate la distanțe mici o serie de grupări funcționale și de contact, a căror orientare topografică și electrostatică complementară moleculei substratului asigură funcțiunile catalitice ale enzimelor.

Ultimul capitol, scris de K. A. Kafiani, cuprinde o importantă problemă teoretică și practică : *reglarea cu ajutorul metaboliților a aparatului enzimatic al celulei.* Sînt prezentate rezultatele ultimelor cercetări privind sistemul genetic, care asigură aparatul enzimatic al celulei, mecanismul de reglare a formării enzimelor, principalele căi de reglare a acțiunii sistemelor enzimatice în cadrul celulei, printre care : reglarea „izosterică" (adică reglarea de către compușii sistemelor enzimatice care sînt în interacțiune cu centrii activi ai enzimelor) și în special reglarea „allosterică" (adică reglarea asigurată de metaboliți a căror structură nu este asemănătoare cu partenerii reacției enzimatice). Se arată, în încheiere, importanța diferitelor proteine allosterice în sistemul reglator al celulei.

Din cele arătate mai sus rezultă că colectivul de autori a reușit să prezinte într-o formă concisă și accesibilă principalele probleme ale chimiei, ale cineticii și mecanismului de acțiune al enzimelor, oglindind destul de reușit progresele realizate în ultimul timp și problemele asupra cărora își îndreaptă atenția în prezent enzimologia.

C. T. Horovitz,
Institutul central de cercetări agricole,
București



E 1330

OROSZÁGOS MŰSZAKI DOKUMENTÁCIÓS TANÁCS

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 8 (1965)

INDEX ALFABETIC

	Nr.	Pag.
ABRAHAM A. şi E. A. PORA, Acţiunea hormonilor sexuali asupra metabolismului acizilor nucleici şi al proteinelor din timus şi splină	2	141
ALEXANDRESCU V., Comportarea electroforetică a proteinelor solubile din frunzele de porumb	2	151
ALGEORGE G., EUG. PĂUNESCU şi M. STOIAN, Cercetări asupra relaţiilor dintre anticorpii antituberculofosfatid şi globulinele serice	2	155
BODEA C., E. NICOARĂ, G. ILLYES şi M. ŞERBAN, Carotinoidele din *Arctodiaptomus salinus* (Daday)	3	271
BOTOŞĂNEANU L., Despicarea totală a plantelor pentru cercetări biochimice comparative	3	335
BRAD I., Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota I. Studiul comparativ al conţinutului în vitamină C la cerealele de toamnă în timpul iernii	2	163
BRAD I., Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota II. Studiul comparativ al activităţii catalazei la cerealele de toamnă, în timpul iernii	3	293
BURUIANĂ L. M. şi V. PAVLU, Cercetări polarografice asupra proteinelor din plasma seminală. Nota II. Acţiunea periodatului şi a hidroxilaminei asupra proteinelor plasmatice	1	17
CÂRSTEANU M., Exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană normală	2	177
CHIŞIU N. ŞT., Constituenţi antigenici proprii şi de origine sanguină în bila hepatică şi veziculară umană	4	429
COMES V., V. GALEA, M. WEINLICH şi D. SUCIU, în colaborare cu C. VALACZKAI, F. VLAD şi I. DÉNES, Necesarul de vitamină C la muncitorii expuşi la mercur	1	33
COSTĂCHEL O., I. KIŢULESCU şi D. PASCU, Efectul grefei tumorale asupra variaţiilor mucoproteinelor serice la şobolani	2	137
CSONTOS A., Acţiunea histaminei, adrenalinei şi ACTH-ului asupra activităţii catalazei sanguine	3	307
DINESCU G. şi A. CURIGUŢ, Interacţiunea citocromului *c* cu fosfolipidele tisulare	2	181
DINESCU G. şi P. TĂUTU, Acţiunea endoxanului asupra conţinutului în lipide a unor tumori experimentale	2	187
DINU I., Influenţa cantităţii şi calităţii proteinelor asupra activităţii unor enzime din ficat	4	443
FURNICĂ G., Modificarea complecşilor metal-proteine la proteinele supuse acţiunii radiaţiilor gamma	3	313

	Nr.	Pag.
FURNICĂ G. şi M. RADU, Modificarea conductibilităţii electrice la biopolimerii iradiaţi	4	453
GHEROGHIU A., E. IONESCU-MATIU şi V. CALCANDI, Izolarea şi identificarea unor alcaloizi din *Thalictrum minus* L. var. *elatum* (Jack) Schinz et kell	2	193
GHEORGHIU A., E. IONESCU-MATIU şi P. G. PLOAIE, Influenţa infecţiei virotice asupra cantităţii şi calităţii conţinutului în alcaloizi din *Vinca rosea* L. (*Catharanthus roseus* G. Don)	4	457
GHEŢIE V., D. MOŢET şi C. DRAGOMIRESCU, Procedeu rapid pentru prepararea agarozei	3	337
GONŢEA I., A. RUJINSKI, S. DUMITRACHE şi P. ŞUŢESCU, Bilanţul calciului la om în cursul activităţii musculare	4	417
IONESCU M., Caracterul variabilităţii chimice a plantelor (cazul speciei *Zea Mays*)	1	13
IORDACHE C., Rolul fosfagenului în procesele biochimice care stau la baza fenomenului de contracţie musculară	4	475
KAPRI A., Procedeu de obţinere a benzilor cromatografice folosite în metoda Mathias	3	343
KAPRI A. şi H. ARAŢEI, Biochimia lichidului folicular	3	319
KEREKES M. şi P. FURDA, Acţiunea protectoare a unor glucide asupra denaturării prin căldură a tripsinei	2	199
KIŢULESCU I., V. BĂLUŢĂ şi D. PASCU, Metodă pentru extragerea glicopeptidelor din materiale biologice (albuş de ou, ser uman)	1	49
KIŢULESCU I., V. BĂLUŢĂ şi D. PASCU, Mucoproteinele serice ca mijloc de diferenţiere a proteazelor din serul animalelor purtătoare şi al celor nepurtătoare de tumori	1	55
KIŢULESCU I., D. PASCU şi A. CURIGUŢ, Acţiunea histaminei şi tiaminpirofosfatului asupra nivelului mucoproteinelor serice la şobolanii canceroşi	2	205
MACOVSCHI E., Unele probleme ale mecanismelor de reglare şi ale structurii materiei vii	3	253
MACOVSCHI E., Materia vie şi distribuţia asimetrică a electroliţilor dintre protoplasmă şi lichidul interstiţial (Bazele teoriei structurii şi comparaţia lor cu bazele teoriilor membranei şi sorbţiei)	4	371
MANTA I., O. BÎRZU, V. BOTEZ, R. CĂTANĂ şi I. BODEA, Competiţia substraturilor pentru enzimele respiratorii ca factor de control a oxidărilor biologice	2	127
MOŢET D., Modificarea proprietăţilor antigenice ale proteinelor din serul sanguin uman în urma denaturării termice. Nota II. Cercetări asupra fenomenului de „omogenizare electroforetică"	1	59
NEAMŢU G., V. TĂMAŞ şi C. BODEA, Cercetări asupra pigmenţilor din plante endemice. Nota I. Carotinoidele din *Astragalus peterfii*	1	67
NEAMŢU G., V. TĂMAŞ şi C. BODEA, Cercetări asupra pigmenţilor din plante endemice. Nota II. Carotinoidele din cîteva specii endemice hibride ale genului *Hieracium*	4	413
OERIU S. şi G. ORGHIDAN, Dinamica valorilor vitaminei C în funcţie de vîrstă şi sub acţiunea tratamentului cu cisteină şi folcisteină	3	277
OERIU S., V. COJOCARU, T. SPANDONIDE, V. APOSTOL şi L. CIURTIN, Hormonii *17*-cetosteroizi şi fenolsteroizi în funcţie de vîrstă şi tratament cu substanţe emiţătoare de grupări —SH la oameni	3	283
PĂUNESCU EUG. şi L. BERGER, Valoarea unor teste biochimice pentru diagnosticul diferenţial al cancerului bronhopulmonar	1	71
PĂUNESCU EUG. şi E. HADÎRCA-ILICA, Reactivitatea biochimică şi imunologică a macrofagului histioid. Nota III. Activitatea fosfoesterazică	2	211
POPESCU A. şi M. CÂRSTEANU, Explorarea exocolului uterin prin exosmoza electroliţilor	2	221
RACOVEANU N., V. STĂNCULESCU şi E. TRUŢĂ, Studiul repartiţiei ^{65}Zn în fracţiunile proteice ale serului de cobai	4	467

	Nr.	Pag.
RĂDULESCU T. şi D. COTARIU, Acţiunea narcozei asupra nivelului fosfocreatinei din muşchi	1	77
SLUŞANSCHI H., Cîteva observaţii cu privire la folosirea calculelor statistice în cercetările de biochimie	3	345
SPORN A. şi I. DINU, Cercetări asupra respiraţiei celulare în intoxicaţia experimentală cu arsen	2	225
SZÀNTAI I., Z. URAY şi V. KOVACS, Observaţii referitoare la schimbul izotopic între aminoacizii iodaţi şi ^{131}I pe hîrtia cromatografică	1	81
SZÀNTAI I., Z. URAY şi T. HOLAN, Metodă rapidă de determinare a indicelui de conversie a iodului mineral în iod proteic marcat cu ^{131}I	1	85
ŞELARIU C., V. GHEŢIE şi S. MIHĂESCU, Hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor şi anticorpilor fluorescenţi de iepure	1	89
TĂNĂSESCU D., Glicoliza aerobă, fosforilaza *a* şi aldolaza în cursul contracţiei musculare	3	325
TURCU GR., V. VASILESCU, A. CIUREŞ şi A. ŞT. ALBU, Studiu citochimic şi citospectrofotometric pe leucocitele şobolanilor iradiaţi intern cu ^{32}P. Nota III. Utilizarea unui complex vitaminic ca radioprotector	2	235
VAICUM L., E. GRUIA şi S. GODEANU, Determinarea unor activităţi enzimatice ca metodă de cercetare a nămolului activ	1	97
VOICULEŢ N., F. CHIRALEU şi C. VILĂU, Studiul repartiţiei şi metabolizării substanţelor citostatice endoxan şi TSPA, marcate cu ^{32}P, la şobolani.	1	109

REVISTE PUBLICATE DE
EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE CHIMIE
REVUE ROUMAINE DE CHIMIE
STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE
REVUE ROUMAINE DE BIOCHIMIE

Pentru a vă asigura colecţia completă şi primirea la timp a revistei, reînnoiţi abonamentul dv. pe anul 1966.

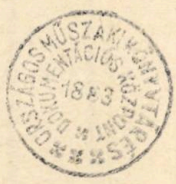
În ţară, abonamentele se primesc la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii de presă din întreprinderi şi instituţii.

Comenzile de abonamente din străinătate se primesc la CARTIMEX, Bucureşti, Căsuţa poştală 134—135 sau la reprezentanţii săi din străinătate.

Apare de 4 ori pe an

Preţul unui abonament individual este de lei 48.

Preţul unui abonament pentru instituţii şi întreprinderi este de 12 lei.



„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. ; *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzuanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

1966 MAR - 4

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală**, partea I. **Fitochimie**, vol. I, 1964, 747 p., 41 lei.

I. HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 1960, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI, I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 1960, 96 p., 3,65 lei.

C. C. OPRESCU, **Infecţia cu micobacterii**, 1963, 224 p. + 5 pl., 12,20 lei.

R. PORTOCALĂ şi N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie**, 1962, 180 p., 9,90 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 1961, 429 p. 22,80 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN şi N. CARP, **Histochimia şi fiziopatologia mucopolizaharidelor**, 1963, 284 p. + 2 pl., 20 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 8, NR. 4, P. 369—492, BUCUREŞTI, DECEMBRIE 1965

I. P. „Informaţia" — c. 3690

43816

Lei 12.—